

**Humanisierung und funktionelle Charakterisierung eines gegen
Herpes Simplex Viren Typ-1 und Typ-2 (HSV-1 und HSV-2)
gerichteten murinen monoklonalen Antikörpers**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie und Geografie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Adalbert Krawczyk

aus Kattowitz
24.09.2010

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen und am Nationalen Centrum für Tumorerkrankungen des Universitätsklinikums Heidelberg durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Roggendorf

2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Elke Cario

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2010

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	8
1.1.	Herpesviren	8
1.1.1.	Allgemeine Übersicht der Herpesviren	8
1.1.2.	Morphologie von Herpesviren.....	9
1.1.3.	Herpes Simplex Viren (HSV-1 und HSV-2)	10
1.1.3.1.	Genomstruktur.....	10
1.1.4.	HSV - Replikationszyklus	12
1.1.5.	Das Latenzstadium	14
1.1.6.	Epidemiologie	14
1.1.7.	Klinischer Verlauf von HSV-1 / HSV-2 Infektionen	15
1.1.8.	Antivirale Immunantwort	15
1.1.9.	Therapie von Herpes Simplex Virusinfektionen mittels Virustatika	16
1.1.10.	Stand der Impfstoffentwicklung zur Prophylaxe von HSV-1/HSV-2-Infektionen	17
1.2.	Therapeutische Antikörper.....	18
1.2.1.	Übersicht klinisch eingesetzter antiviraler Antikörper	18
1.2.2.	Wirkungsmechanismen antiviraler Antikörper.....	18
1.2.3.	Muriner monoklonaler Antikörper mAk 2c.....	20
1.2.4.	Molekulare Struktur und Funktion von Antikörpern.....	22
1.2.5.	Nutzbarmachung muriner Antikörper durch Humanisierung	25
1.2.6.	Das NOD/SCID-Mausmodell.....	27
1.3.	Zielsetzung.....	27
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	29
2.1.	Material	29
2.1.1.	Laboraausstattung	29
2.1.2.	Verbrauchsmaterialien.....	30
2.1.3.	Chemikalien.....	31
2.1.4.	Lösungen und Puffer	33
2.1.5.	Reagenzien für die Zellkultur	37
2.1.6.	Kommerzielle Kits	37
2.1.7.	Kommerzielle Reagenzien für die Molekularbiologie.....	38
2.1.8.	Oligonukleotide	38
2.1.9.	Standards	39
2.1.10.	Proteine.....	39
2.1.11.	Antikörper	40
2.1.12.	Immunseren	41
2.1.13.	Enzyme.....	41
2.1.14.	Vektoren	42
2.1.14.1.	pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO	42

2.1.14.2.	pHOG21	42
2.1.14.3.	pEUC6B	43
2.1.14.4.	pEE12.1	44
2.1.15.	Zelllinien	45
2.1.15.1.	Vero-Zelllinie	45
2.1.15.2.	2c-Hybridom-Zelllinie	45
2.1.15.3.	SP2/0-Ag14 Zelllinie	45
2.1.15.4.	NSO-Zelllinie	45
2.1.16.	Bakterien	46
2.1.17.	Viren	46
2.1.17.1.	Laborstämme	46
2.1.17.2.	Klinische Virusisolate	46
2.1.18.	Computerprogramme und Internetseiten	47
2.1.19.	Versuchstiere	47
2.1.19.1.	Das NOD/SCID-Mausmodell	47
2.2.	Methoden	48
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden	48
2.2.1.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	48
2.2.1.2.	Real-Time PCR	48
2.2.1.3.	Extraktion und Aufreinigung von mRNA aus der Hybridom-Zelllinie	49
2.2.1.4.	Amplifikation der mAk 2c V _H & V _L Sequenzen mit RACE-PCR	50
2.2.1.5.	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	51
2.2.1.6.	Restriktionsspaltung von DNA	52
2.2.1.7.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	52
2.2.1.8.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	52
2.2.1.9.	Dephosphorylierung von 5'-Enden der linearisierten Expressionsvektoren	53
2.2.1.10.	Ligation von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren	53
2.2.1.11.	TOPO-TA-Klonierung	53
2.2.1.12.	Klonierung des 2c-scFv-Gensequenzen	54
2.2.1.13.	Transformation kompetenten Bakterien	55
2.2.1.14.	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	55
2.2.1.15.	Transformation elektrokompeter Bakterien	56
2.2.1.16.	Blau-Weiß-Screening	56
2.2.1.17.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> Bakterien	56
2.2.1.18.	Ethanolpräzipitation von DNA	57
2.2.1.19.	Sequenzierung doppelsträngiger DNA	57
2.2.2.	Proteinbiochemische Methoden	57
2.2.2.1.	Produktion des löslichen 2c-scFv-Antikörpers in <i>E.coli</i>	57
2.2.2.2.	Aufreinigung des 2c-scFv-Antikörpers mittels Ni-NTA-IMAC und FPLC	58
2.2.2.3.	Aufreinigung monoklonaler IgG-Antikörper	59
2.2.2.4.	Generierung von 2c-F(ab') ₂ -Fragmenten durch Pepsin-Verdau	59

2.2.2.5.	Generierung von 2c-Fab-Fragmenten durch Papain-Verdau	60
2.2.2.6.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
2.2.2.7.	Western-Blot-Analyse	60
2.2.2.8.	Charakterisierung des mAk 2c Epitops mittels SDS-PAGE	61
2.2.2.9.	Isoelektrische Fokussierung	62
2.2.2.10.	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	62
2.2.3.	Immunologische Methoden	63
2.2.3.1.	ELISA-Testverfahren (Enzyme-linked immunosorbent assay)	63
2.2.3.2.	Selektion von mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4 Transfektanden	63
2.2.3.3.	Antikörpervermittelte Inhibition des „cell-to-cell spreads“	64
2.2.3.4.	Durchflusszytometrie „fluorescence activated cell sorting“ (FACS)	65
2.2.3.5.	Durchflusszytometrische Bestimmung der funktionellen Affinität	65
2.2.3.6.	Untersuchung der biophysikalischen Stabilität	66
2.2.3.7.	Kompetitionsstudien zur Analyse der Epitopspezifität von Antikörpern	66
2.2.4.	Zellkulturmethoden	67
2.2.4.1.	Kultivierung von Zellen	67
2.2.4.2.	Kultivierung von Vero-Zellen	67
2.2.4.3.	Kultivierung der 2c-Hybridomzellen	67
2.2.4.4.	Kultivierung von NS0-Zellen	67
2.2.4.5.	Kultivierung Antikörper-produzierender SP2/0-Myelomzellen	68
2.2.4.6.	Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität	68
2.2.4.7.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	68
2.2.4.8.	Transfektion von NS0-Zellen	68
2.2.4.9.	Eukaryotische Produktion des löslichen 2c-scFv-Antikörpers in NS0-Zellen	69
2.2.4.10.	Produktion des murinen monoklonalen Antikörpers mAk 2c	69
2.2.4.11.	Produktion der rekombinanten Antikörper ch2c und hu2c V1-V4	70
2.2.4.12.	Herstellung eines Herpes-Simplex-Virus-Stocks	70
2.2.4.13.	Bestimmung des HSV-Titers mittels Endpunkttitration	70
2.2.4.14.	HSV-Neutralisationstest	71
2.2.4.15.	Untersuchung des Neutralisationsmechanismus von mAk 2c	72
2.2.4.16.	Kreuzvernetzung neutralisierender 2c-Fab-Fragmente	72
2.2.4.17.	Aktivierung der komplementabhängigen Zytotoxizität (CDC)	72
2.2.4.18.	Untersuchung Inhibition der mAk 2c- bzw. mAk hu2c V1-vermittelten Effektorzell-Aktivierung durch den HSV-gE/gI-Komplex	74
2.2.5.	Bioinformatische Methoden	75
2.2.5.1.	Humanisierung des murinen monoklonalen Antikörpers 2c	75
2.2.6.	Tierexperimente	76
2.2.6.1.	Infektion von NOD/SCID-Mäusen mit Herpesviren	76
2.2.6.2.	Passive Immunisierung	77
2.2.6.3.	Postexpositionsprophylaktische Behandlung nach Infektion mit HSV-1 F	77
2.2.6.4.	Postexpositionsprophylaktische Behandlung nach Infektion mit HSV-1 R10.2	77

3.	ERGEBNISSE	79
3.1.	Produktion des mAk 2c und dessen Derivate F(ab')₂, Fab und scFv	79
3.1.1.	Produktion und Aufreinigung des mAk 2c	79
3.1.2.	Generierung und Aufreinigung der mAk-2c Derivate 2c-Fab und 2c-F(ab') ₂	80
3.1.3.	Generierung und Produktion des 2c-scFv	81
3.1.3.1.	Bestimmung der authentischen V _H - und V _L -Sequenzen	81
3.1.3.2.	Klonierung und bakterielle Expression des scFv	83
3.1.3.3.	Eukaryontische Expression des 2-scFv-Antikörpers	86
3.2.	Funktionelle in vitro Charakterisierung des mAk 2c und der 2c-Derivate	88
3.2.1.	Charakterisierung des durch mAk 2c erkannten Epitops	88
3.2.2.	Bestimmung der funktionellen Affinität	89
3.2.3.	Neutralisationseffizienz bivalenter und monovalenter Antikörper <i>in vitro</i>	90
3.2.4.	Untersuchung des Neutralisationsmechanismus von mAk 2c	93
3.2.5.	Inhibition des "cell-to-cell spreads" durch mAk 2c und dessen Derivate	94
3.3.	Chimärisierung und Humanisierung des murinen Antikörpers mAk 2c	95
3.3.1.	Produktion und Aufreinigung von mAk ch2c und hu2c V1-V4	98
3.4.	Funktionelle in vitro Charakterisierung der rekombinanten Antikörper	98
3.4.1.	Bestimmung der funktionellen Affinität von mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4	98
3.4.2.	Kompetitionsstudien	100
3.4.3.	Antivirale Aktivität von mAk ch2c und der humanisierten Varianten <i>in vitro</i>	101
3.4.4.	Biophysikalischen Stabilität von mAk 2c, mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4	102
3.4.5.	Inhibition des „cell-to-cell spreads“ durch mAk ch2c und mAk hu2c V1	103
3.4.6.	Untersuchung der Fähigkeit zur Komplementaktivierung des hu2c V1	104
3.4.7.	Untersuchung der Inhibition der mAk 2c- bzw. mAk hu2c V1 vermittelten Effektorzell-Aktivierung durch den HSV-gE/gI-Komplex	105
3.5.	Neutralisation klinisch isolierter HSV-Stämme durch mAk hu2c V1	109
3.6.	Funktionelle Charakterisierung von mAk 2c und mAk hu2c V1 in vivo	112
3.6.1.	Etablierung eines HSV-NOD/SCID-Mausmodells	112
3.6.1.1.	Bestimmung der zur Infektion benötigten Virusdosis	112
3.6.1.2.	Dosisfindung der zur Prophylaxe einer HSV-Infektion erforderlichen mAk 2c Antikörpermenge	113
3.6.2.	Immunprophylaxe einer HSV-1 F Infektion durch hu2c V1	117
3.6.3.	Postexpositions-Prophylaxe von HSV1 F infizierten NOD/SCID-Mäusen mit mAk hu2c V1	120
3.6.4.	Postexpositions-Prophylaxe von NOD/SCID-Mäusen nach Infektion mit dem multiresistenten Isolat HSV-1 R10.2	122

4.	DISKUSSION	125
4.1.	Funktionelle Charakterisierung des mAk 2c und seiner Derivate <i>in vitro</i>	126
4.2.	Chimärisierung und Humanisierung des murinen Antikörpers mAk 2c	130
4.3.	Funktionelle Charakterisierung von mAk ch2c und mAk hu2c V1 <i>in vivo</i>	134
4.4.	Ausblick	137
5.	ZUSAMMENFASSUNG	139
5.1.	Zusammenfassung auf Deutsch	139
5.2.	Zusammenfassung auf Englisch / summary	141
6.	LITERATURVERZEICHNIS	142
7.	ANHANG	155
7.1.	Abkürzungsverzeichnis	155
7.2.	Abbildungsverzeichnis	159
7.3.	Tabellenverzeichnis	160
7.4.	Publikationsverzeichnis	161
7.5.	Danksagung	162
7.6.	Lebenslauf	163
7.7.	Erklärungen	164

1. Einleitung

1.1. Herpesviren

1.1.1. Allgemeine Übersicht der Herpesviren

Der Name „Herpes“ leitet sich von dem griechischen Wort „herpein“ ab, das „kriechen“ bedeutet. Herpesviren zählen zu den weltweit am weitesten verbreiteten viralen Infektionserregern. Mehr als 200 unterschiedliche Herpesviren wurden bisher bei allen fünf Ordnungen der Vertebraten (Säugetiere, Vögel, Amphibien, Reptilien und Fische) und bei invertebraten Tieren (Mollusken) nachgewiesen (55). Ein charakteristisches Merkmal der Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach einer Erstinfektion eine latente, lebenslang persistierende Infektion zu etablieren. Alle bekannten Herpesviren sind in der Ordnung Herpesvirales eingegliedert. Diese unterteilt sich in die Familie der Herpesviridae, die die Herpesviren des Säugetiere enthält, die Familie der Alloherpesviridae, in der die Fisch- und Amphibienherpesviren zusammengefasst sind und die Familie der Malacoherpesviridae, welche Herpesviren der Invertebraten umfasst (49). Die Familie der *Herpesviridae* lässt sich aufgrund der Pathogenität, des Zell-Tropismus und der Replikations-Eigenschaften in die drei Subfamilien *α -Herpesvirinae*, *β -Herpesvirinae* und *γ -Herpesvirinae* unterteilen (96, 97). Alphaherpesviren zeichnen sich durch einen vergleichsweise kurzen Replikationszyklus aus (< 24 Stunden), und weisen ein breites Wirtsspektrum auf (55). Die Etablierung einer latenten Infektion erfolgt in den Nervenzellen der Ganglien im peripheren Nervensystem. Betaherpesviren hingegen replizieren deutlich langsamer (2–4 Tage) und sind streng speziesgebunden (192). Die Latenz wird in den Spinalganglien und den sekretorischen Drüsen ausgebildet. Gammaherpesviren zeichnen sich analog zu den Betaherpesviren durch ein sehr enges Wirtszellspektrum aus. Sie infizieren überwiegend Lymphozyten, teilweise auch Epithel- und Fibroblastenzellen, wo sie auch die Ausbildung einer Latenz induzieren. Die Dauer des Replikationszyklus variiert bei den verschiedenen Virustypen zwischen 36 und 60 Stunden. Der Mensch ist Wirt von insgesamt acht Herpesviren, die chronologisch nach ihrer Entdeckung nummeriert sind und taxonomisch als Humane Herpesviren (HHV) 1–8 bezeichnet werden (Tab. 1). Herpesviren sind beim Menschen mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert, die aufgrund der lebenslangen Persistenz der Viren im Wirtsorganismus und der periodischen Reaktivierungen an klinischer Bedeutung zunehmen.

Tab. 1: Klassifizierung humanpathogener Herpesviren.

Subfamilie	Genus	Trivialname	Taxonomische Bezeichnung
<i>α-Herpesvirinae</i>	Simplexvirus	Herpes Simplex Virus 1	(HHV-1; HSV-1)
		Herpes Simplex Virus 2	(HHV-2; HSV-2)
	Varicellovirus	Varizella-Zoster-Virus	(HHV-3; VZV)
<i>β-Herpesvirinae</i>	Zytomegalovirus	Humanes Zytomegalovirus	(HHV-5; HCMV)
	Roseolovirus	Humanes Herpesvirus 6	(HHV-6)
		Humanes Herpesvirus 7	(HHV-7)
<i>γ-Herpesvirinae</i>	Lymphocryptovirus	Epstein-Barr-Virus	(HHV-4; EBV)
	Rhadinovirus	Humanes Herpesvirus 8	(HHV-8)

1.1.2. Morphologie von Herpesviren

Die Vertreter der Familie der Herpesviridae weisen biologische und morphologische Gemeinsamkeiten auf. Die Größe der Herpesvirus-Partikel (Virionen) liegt zwischen 120 und 300 nm (173). Die Virionen der verschiedenen Herpesviren zeichnen sich durch einen ähnlichen strukturellen Aufbau aus und bestehen aus vier morphologisch abgrenzbaren Strukturen: Kern (Core), Kapsid, Tegument und Virushülle (Abb.1).

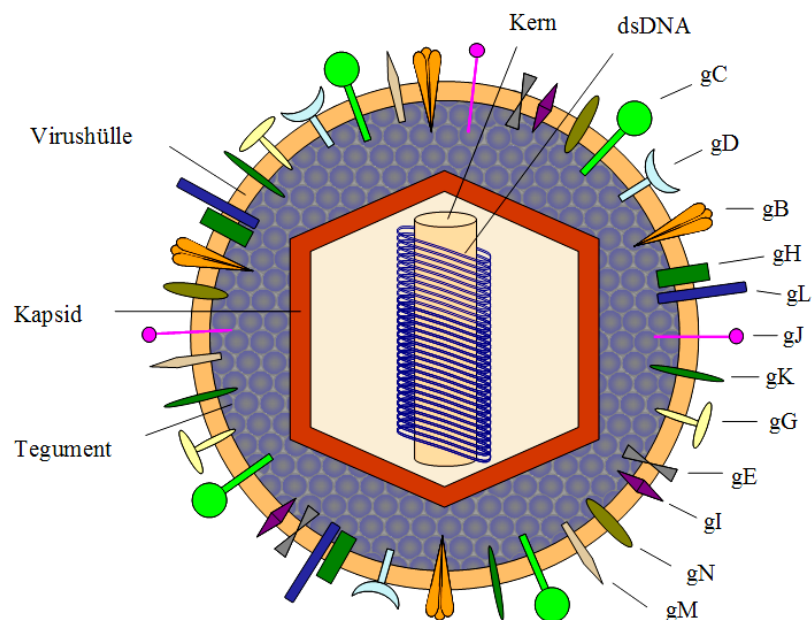


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Herpes-Virions. Das Virus besteht aus einem ikosaederförmigen Nukleokapsid, in dessen Innern sich eine um den Kern gewickelte, doppelsträngige DNA befindet. Dieses Nukleokapsid ist von einer Doppelmembran mit 12 integrierten viralen Glykoproteinen umgeben. Zwischen der Hüllmembran und dem Nukleokapsid befindet sich das Tegument.

Der Kern hat einen Durchmesser von 75 nm und ist ringförmig von der linearen doppelsträngigen Virus-DNA umgeben (14, 115). Die Genomgröße variiert innerhalb der Familie der Herpesviridae zwischen 124 kbp (VZV) und 300 kbp (Koi-Herpesvirus). Der Kern wird von einem 100 nm großen, ikosaedrischen Nukleokapsid umschlossen (213), welches sich aus 162 Kapsomeren (150 Hexamere und 12 Pentamere) zusammensetzt (51, 124). Das Kapsid wird wiederum von einer aus dem Membrangeflecht des Golgi-Netzwerkes der Wirtszelle abstammenden Lipidhülle umgeben, in die zahlreiche Glykoproteine eingelagert sind (Abb. 1) (78, 202, 218). Bisher wurden 12 virale Oberflächen-Glykoproteine (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM und gN) identifiziert, die an den unterschiedlichen Phasen der viralen Replikation funktionell beteiligt sind. Hierbei unterscheidet man die Adsorption des Virus an die Wirtszelle, die durch Membranfusion zwischen der Virushülle und der Zytoplasmamembran der Zielzelle vermittelte Penetration des Virions ins Zellinnere, die direkte Virus-Ausbreitung von einer infizierten Zelle zur nicht-infizierten Nachbarzelle („cell-to-cell spread“) und die virusinduzierte Fusion infizierter Zellen (71, 168, 173). Der Zwischenraum zwischen dem Kapsid und der Lipidhülle besteht aus einer als Tegument bezeichneten Proteinschicht (3). Das Tegument umfasst annähernd 20 Proteine, welche im Zuge der Infektion zusammen mit dem Kapsid in die Zielzelle gelangen und während der frühen Phase der Virusreplikation regulatorische Funktionen übernehmen (1, 135, 144).

1.1.3. Herpes Simplex Viren (HSV-1 und HSV-2)

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung und Charakterisierung eines monoklonalen Antikörpers zur Behandlung von Herpes Simplex Virus Infektionen. Aus diesem Grund werden die Eigenschaften und die Replikation der Herpesviren exemplarisch am Beispiel von HSV-1 bzw. HSV-2 beschrieben.

1.1.3.1. Genomstruktur

Das Genom von HSV Typ 1 und HSV Typ 2 besteht aus einer linearen, doppelsträngigen DNA einer Größe von 152 kb. Nach der Infektion der Zielzellen wird die lineare DNA in ein zirkuläres Molekül überführt, und liegt im Zellkern als Episom vor. Dieses ist in ein langes (U_L , 126.000 bp) und ein kurzes Segment (U_S , 26.000 bp) unterteilt. Beide Segmente werden durch repetitive Sequenzen (R_L) bzw. (R_S) flankiert (Abb. 2). Auf dem Genom befinden sich ca. 90 offene Leseraster, die für mindestens 84 virale Proteine kodieren (141).

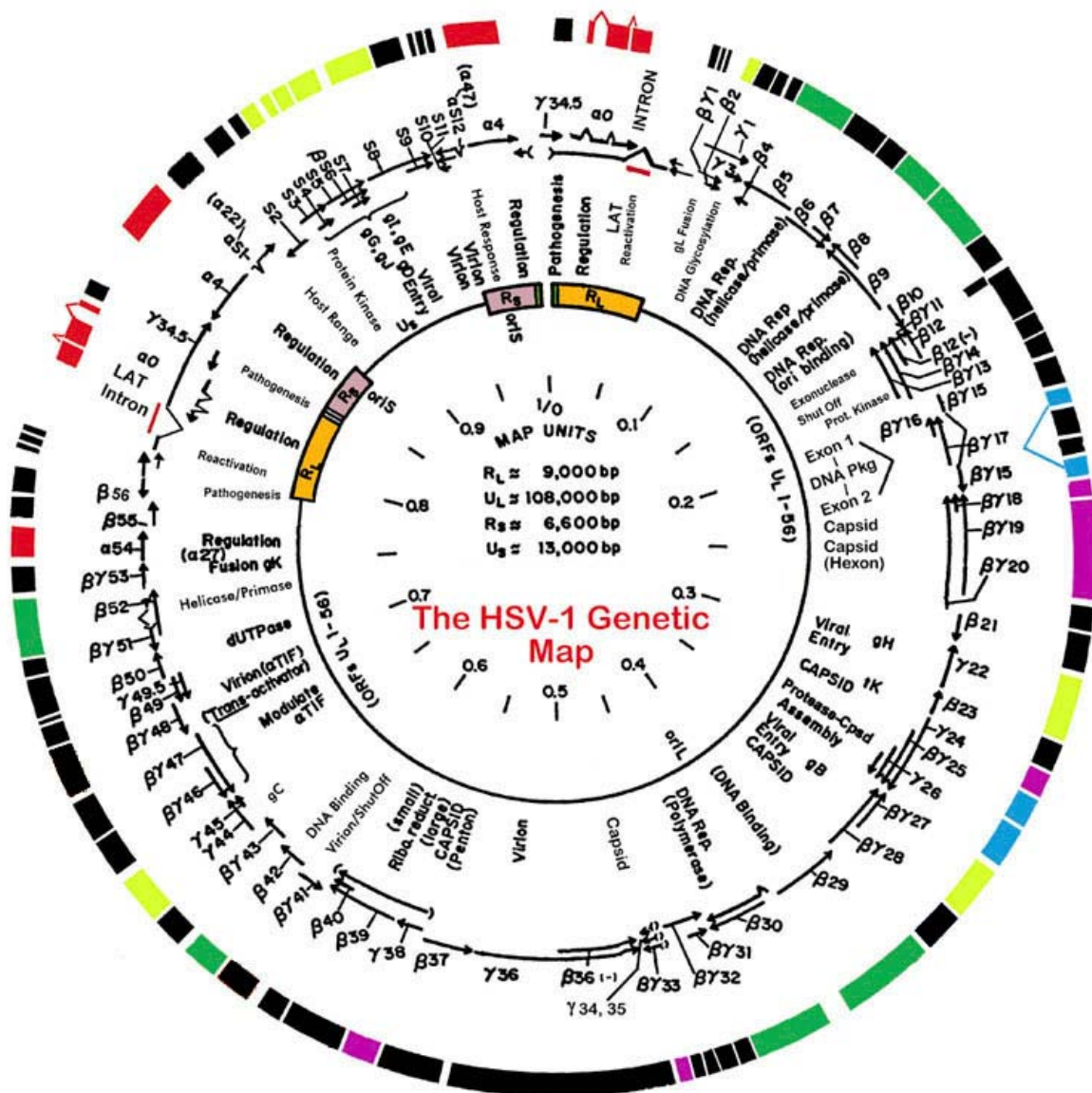


Abb. 2: Übersicht der offenen Leserahmen (ORFs) im Genom von HSV-1. Der innere Kreis beschreibt die Organisation des Genoms in 2 einmalig vorkommende Segmente (U_L und U_S) und in flankierende, repetitive DNA-Sequenzen (R_L , R_S). Die 3 Startpunkte der DNA-Replikation befinden sich mittig der U_L -Region (ori_L) und innerhalb der R_S -Sequenzen (ori_S) (160). Die Funktion und ggf. der Trivialname der kodierten Proteine ist an der entsprechenden Lokalisation im Genom angegeben. Die kreisförmig angeordneten schwarzen Pfeile repräsentieren die Transkriptionskarte. Die Richtung gibt die Orientierung der korrespondierenden mRNA an. Die arabischen Ziffern geben die Nummer des offenen Leserahmens an. Die Buchstaben α , β und γ definieren den Zeitpunkt der Genexpression (sehr früh, früh und spät). Die Gene einer vergleichbaren Funktion sind farblich gekennzeichnet. Rot = regulatorische Funktion, Grün = Genom-Replikation, Lila = Kapsid-Strukturproteine, Gelb-Grün = Oberflächen-Glykoproteine. Die Abbildung wurde modifiziert nach Roizman *et al.* 1996 (173) und Wagner E. (<http://darwin.bio.uci.edu/>).

1.1.4. HSV - Replikationszyklus

Der Replikationszyklus der Herpesviren beginnt mit der Adsorption der Viren an die Wirtszelle (Abb. 3). Die Anlagerung des Virus an die Zielzelle wird durch initiale Bindung der HSV-Glykoproteine B (gB) und C (gC) an Heparansulfat- und Chondroitin-Proteoglycane (HSPG oder CSPG) eingeleitet (34, 92, 181). Diese Wechselwirkungen sind für die Virus-Adsorption nicht wesentlich, begünstigen jedoch die essentiellen Bindungen der Glykoproteine gB und gD an zelluläre Rezeptoren. Das gB bindet an den Rezeptor α -PIRL („ α paired immunoglobulin-like type 2 receptor“) bzw. einen noch nicht identifizierten Rezeptor (177, 209). Eine genaue Bedeutung dieser Interaktion ist noch nicht erforscht. Die Bindung des gD an einen der zellulären Rezeptoren Nektin-1, HVEM („herpes virus entry mediator“) oder eine modifizierte Form des HSPG (3-OS-Heparansulfat-Proteoglycan) induziert eine Konformationsänderung des gD (177, 209). Dadurch kommt es zu einer Aktivierung des Membranfusions-Komplexes, bestehend aus dem trimären gB und dem Heterodimer gH/gL, und der damit assoziierten Fusion der Virushülle mit der Zytoplasmamembran der Zielzelle (28, 125, 189). Nach anschließender Freisetzung des Nukleokapsids in das Zellinnere wird dieses entlang der Mikrotubuli zu dem Kernporenkomplex transportiert (107, 157), wo es zur Einschleusung der viralen DNA in das Kernplasma kommt (165). Nach der anschließenden Zirkularisation des Genoms kommt es zu einer stufenweise regulierten Expression der α -, β - und γ - Gengruppen (211). In der ersten Phase werden die α -Gene (*immediate early*-Gene) durch die zelluläre RNA-Polymerase II unter Mitwirkung von transkriptionsaktivierenden Tegumentproteinen transkribiert. Die gebildeten mRNAs kodieren für Transkriptionsaktivatoren und Regulatoren der frühen Gene (*early*-Gene), die nach Translation im Zytoplasma zurück in den Zellkern transportiert werden. In der β -Phase werden präferenziell solche Gene exprimiert, die am Nukleotidstoffwechsel (Thymidinkinase) oder DNA-Replikation (Helikase/Primase, virale DNA-Polymerase) beteiligt sind (173). Während der Replikation der genomischen DNA wird die Expression der γ -Gene, die hauptsächlich für Strukturproteine kodieren, eingeleitet. Nach der Bildung der Kapsidvorläufer wird das Virusgenom in die Kapside verpackt (200). Die neu gebildeten Nukleokapside durchdringen die Kernmembran und verlassen den Zellkern im Zuge eines Knospungsprozesses (143). Im Zytoplasma werden die Nukleokapside von einer Tegumentschicht umgeben. Anschließend kommt es zu einer Umhüllung der Nukleokapside durch Knospung in Vesikel des Trans-Golgi-Netzwerks, in deren Membran bereits virale Glykoproteine integriert sind (55). Diese sogenannten exozytotischen Vesikel werden im weiteren Verlauf zur Zytoplasmamembran transportiert. Durch Fusion der Vesikel-Membran

mit der Zytoplasmamembran wird das reife Herpes-Virion aus der Zelle freigesetzt. Neben der Neuinfektion von Zellen durch freigesetzte Viren können sich Herpesviren auch über direkte Zellkontakte von einer infizierten Zelle zur nicht-infizierten Nachbarzelle ausbreiten (148). Dadurch können sich die Viren zwischen epithelialen Zellen oder von epithelialen zu neuronalen Zellen ausbreiten, ohne wesentlich durch neutralisierende Antikörper blockiert zu werden (103). Für diese als „cell-to-cell spread“ bezeichnete Virus-Ausbreitung sind die viralen Proteine gB, gD, gH/gL und gE/gI von essenzieller Bedeutung (53, 103). Der exakte Mechanismus dieser Ausbreitung ist noch nicht hinreichend erforscht.

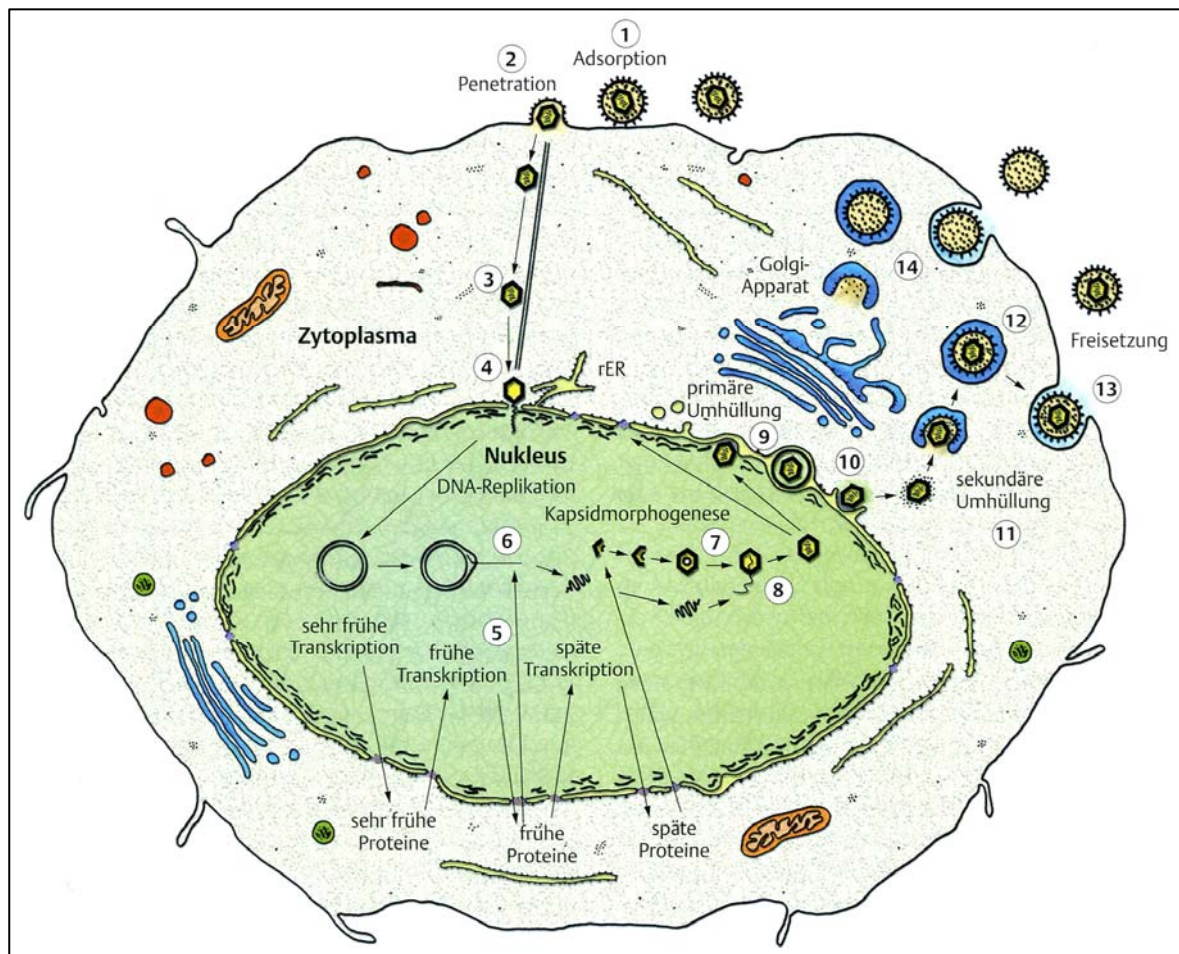


Abb. 3: Schematische Darstellung des herpesviralen Replikationszyklus. 1: Adsorption. 2: Penetration. 3: Transport des Nukleokapsids in den Zellkern. 4: Einschleusung der viralen DNA in den Zellkern. 5: Kaskadenartig regulierte Gen-Expression (α -, β - und γ - Gengruppen). 6: Replikation des Virusgenoms. 7: Generierung der Kapsidvorläufer. 8: Reifung der Nukleokapside durch Verpacken der replizierten Virus-DNA. 9/10: Primärer Knospungsprozess, das Nukleokapsid durchdringt dabei die Kernmembran. 11: Sekundärer Knospungsprozess, das Nukleokapsid wird von Tegument-Proteinen umgeben und anschließend durch Vesikel des Trans-Golgi-Netzwerks umhüllt. 12: Ausbildung zellulärer Vesikel. 13: Freisetzung reifer Herpes-Virionen. 14: Zusammenlagerung von Hüll- und Tegumentproteinen zu unreifen, nichtinfektösen Partikeln. Abbildung aus: Doerr 2010, Medizinische Virologie (55).

1.1.5. Das Latenzstadium

Herpes Simplex Viren besitzen die besondere Fähigkeit, nach einer in der Regel asymptomatischen Primärinfektion einen lebenslangen Zustand der Latenz in den Ganglienzellen zu manifestieren (173). Aus der Familie der Herpesviridae etablieren Herpes Simplex Viren eine latente Infektion in den sensorischen Ganglien (19, 195). Anders als z.B. bei Retroviren wird das Virusgenom nicht in das menschliche Erbgut integriert, sondern persistiert als zirkuläre, doppelsträngige DNA (Episom) im Zellkern (187). Während des Latenzstadiums werden keine infektiösen Viren gebildet. Die Genexpression während der Latenz unterscheidet sich grundlegend von der Genexpression beim lytischen Infektionszyklus. Im Gegensatz zu der komplexen Transkription und Expression der viralen Gene bei der produktiven, lytischen Infektion kommt es während der latenten Infektion nur zur Expression einer nicht-kodierenden RNA, der sogenannten Latenz-assoziierten Transkripte (LAT) (109). Die LAT-RNA kodiert nicht für ein virales Protein, sondern fungiert als Vorläufer für microRNAs (miRNA), die das Latenzstadium regulieren und der infizierten Zelle einen protektiven Effekt gegenüber Apoptose vermitteln (80, 204). Durch verschiedene interne und externe Stimuli (z.B. Immunsuppression, psychische Einflüsse, Stresssituationen, UV-Strahlung) kann es zu einer Reaktivierung des latenten Virusgenoms und zur Initiierung der lytischen Genexpressions-Kaskade führen, was mit einer erneuten Produktion infektiöser Viren assoziiert ist (193).

1.1.6. Epidemiologie

Infektionen mit Herpes Simplex Viren treten ubiquitär auf. Die nur beim Menschen vorkommenden Infektionserreger HSV-1 und HSV-2 sind weltweit verbreitet und gehören zu den häufigsten Krankheitserregern. Die Übertragung des HSV-1 Infektionserregers erfolgt meistens bereits im Kindesalter durch Kontakt mit virushaltigem Bläscheninhalt oder Sekreten der Mundhöhle. Das HSV-2 hingegen wird überwiegend durch Genitalsekrete bei Sexualkontakten übertragen. Grundsätzlich ist eine Übertragung von HSV-1 bzw. HSV-2 auch durch asymptomatische Träger möglich, welche jedoch in Relation zu symptomatischen Virusträgern nur geringe Mengen an Viren ausscheiden. Die Seroprävalenz innerhalb der Bevölkerung ist abhängig von sozioökonomischen Faktoren und beträgt bei Erwachsenen 75-95% bei HSV Typ 1 und 15-20% bei HSV Typ 2 (55, 89, 139).

1.1.7. Klinischer Verlauf von HSV-1 / HSV-2 Infektionen

Nach Primärinfektion der Schleimhautzellen des Mund-Rachen-Raumes (überwiegend HSV-1) oder des Genitaltraktes (überwiegend HSV-2) kommt es zunächst zur lokalen HSV-Replikation in den Keratinozyten der Haut oder in den Epithelzellen der Schleimhaut. Der überwiegende Teil der infizierten Personen zeigt einen inapparenten Infektionsverlauf (99 %). Bei etwa 1 % der Infizierten etabliert sich nach einer Inkubationszeit von 6-8 Tagen eine akute Primärerkrankung, die sich vorwiegend durch Manifestation von typischen Herpesbläschen am Eintrittsort der Viren auszeichnet (55). Im Anschluss an die Primärinfektion etabliert sich eine latente Infektion in den Zellen des Trigeminalganglions (HSV-1) oder der Sacralganglien (HSV-2) (55, 148). Rezidive sind bei beiden Erregern mit einer Reaktivierung der Virusreplikation assoziiert, äußern sich durch das erneute Auftreten einer lokalisierten Infektion und werden in der Regel auch ohne therapeutische Intervention in die latente Infektion zurückgeführt. Bei Patienten mit einer Immunsuppression wie z.B. HIV/AIDS-Patienten, Organempfängern, Patienten nach Knochenmarktransplantation (KMT) oder Krebspatienten mit induzierter Schwächung der Immunabwehr durch eine zytostatische Chemotherapie sind dagegen häufig generalisierte Manifestationen der Infektion zu beobachten. Die schweren Krankheitsverläufe sind oft mit Hepatitiden, Ösophagitis, schweren Hautulcerationen sowie einer Herpes-Enzephalitis assoziiert und führen ohne eine wirksame antivirale Therapie zum Tod (72, 131, 133).

1.1.8. Antivirale Immunantwort

Das menschliche Immunsystem verfügt über vielfältige Abwehrmechanismen um exogene Krankheitserreger zu bekämpfen. Man unterscheidet zwischen der natürlichen, angeborenen Immunabwehr und der adaptiven Immunabwehr. Infolge einer primären Exposition mit Pathogenen werden zunächst die Komponenten der angeborenen Immunantwort aktiv. Nach dem Eindringen der Krankheitserreger in den Körper werden diese durch Phagozyten wie Monozyten, Makrophagen, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und dendritischen Zellen durch Phagozytose rasch aufgenommen und abgetötet. Desweiteren wird durch Bindung bestimmter viraler Bestandteile an Toll-like-Rezeptoren die Ausschüttung von Chemokinen, Zytokinen und Interferonen induziert, die eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe auslösen und der Einstrom weiterer Immunzellen bewirken. Eine Besonderheit von Zellen ist die Fähigkeit zur Präsentation von viralen Peptiden über MHC Klasse I (befindet sich auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen) bzw. MHC Klasse II Moleküle (Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen) auf der Zelloberfläche. Auf diese Weise wird die adaptive,

erregerspezifische Immunabwehr aktiviert. Entsprechend den unterschiedlichen Effektorleistungen der Immunzellen werden die zellvermittelte Immunität, vertreten von den T-Lymphozyten und die humorale Immunität, gebildet durch die B-Lymphozyten, unterschieden (55). Nach Selektion und Maturation im Thymus (T-Zellen) und Knochenmark (B-Zellen) zirkulieren die naiven Lymphozyten im Blut und in den sekundären Lymphorganen (Lymphknoten, Milz). Durch Kontakt von naiven T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen kommt es zu deren Aktivierung, Differenzierung und Proliferation. T-Lymphozyten können in $CD4^+$ -T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxische T-Effektorzellen unterteilt werden. $CD8^+$ -Zellen produzieren Zytokine mit antiviraler Wirkung und sind zur Induktion von Apoptose in infizierten Zellen in der Lage. $CD4^+$ -Zellen aktivieren B-Zellen und $CD8^+$ -Zellen durch Ausschüttung von Zytokinen. Im Mausversuch mit immunkomprimierten (SCID) Mäusen erwiesen sich T-Lymphozyten als essenziell zur Beseitigung der akuten Infektion und zur Etablierung der latenten HSV-Infektion (146). B-Lymphozyten exprimieren zunächst membranassoziierte Antikörper (B-Zell-Rezeptoren) auf der Zelloberfläche. Nach spezifischer Antigenbindung und der folgenden Aktivierung durch $CD4^+$ -T-Helferzellen differenzieren B-Lymphozyten zu Plasmazellen, die zur Produktion großer Mengen antigenspezifischer Antikörper in der Lage sind. Antikörper bilden die Bestandteile der humoralen Immunantwort des Immunsystems von Säugetieren. Durch spezifische Erkennung von Oberflächenstrukturen (Epitopen) auf Zielmolekülen von Krankheitserregern tragen Antikörper entscheidend zur Eindämmung einer viralen Infektion bei. Während einer HSV-Infektion im Mensch werden die meisten Antikörper gegen die viralen Glykoproteine gB und gD gebildet (25, 126). Diese Antikörper sind zur Virus-Neutralisation in der Lage, können die Reaktivierungen über den „cell-to-cell spread“ jedoch nicht inhibieren (103).

1.1.9. Therapie von Herpes Simplex Virusinfektionen mittels Virustatika

Zur Behandlung von akuten Primärinfektionen und Reaktivierungen steht eine begrenzte Anzahl antiviraler Medikamente zur Verfügung. Das 1974 entdeckte Aciclovir (ACV) (64) ist immer noch Goldstandard zur Therapie und Prophylaxe von Herpes Simplex Erkrankungen bewährt. Das Nukleosidanalogon ACV ist ein sogenannter Antimetabolit und hemmt in seiner aktiven (phosphorylierten) Form die Virusreplikation. ACV wird nahezu ausschließlich durch die virale Thymidinkinase phosphoryliert und daher nur in infizierten Zellen aktiviert, da die virale Thymidinkinase im Vergleich zur zellulären Thymidinkinase ACV mit einer 3000-fach höheren Effektivität phosphoryliert. Desweiteren weist das aktivierte ACV eine im Vergleich

zur zellulären DNA-Polymerase 100-fach höhere Affinität gegenüber der viralen DNA-Polymerase auf (12). Aufgrund dieser Eigenschaften ist ACV zur spezifischen Hemmung der viralen Replikation in der Lage, ohne dabei die nichtinfizierten Zellen signifikant zu schädigen. Der Einsatz von ACV ist daher auch nicht mit signifikanten Nebenwirkungen assoziiert. Ein schwerwiegendes Problem stellt jedoch die zunehmende Etablierung resistenter HSV-Stämme dar. Die natürliche Durchseuchung mit ACV-resistenten Virusstämmen innerhalb der immunkompetenten Bevölkerung liegt durchschnittlich bei 0,3% (11, 20, 41, 44). Bei immunsupprimierten Patienten (HIV/AIDS-Patienten, Chemotherapie-Empfänger etc.) liegt das Risiko der Ausbildung einer ACV-Resistenz im Zuge einer langandauernden prophylaktischen und therapeutischen Behandlung bereits bei 4-7 % (12, 41, 47, 65). Bei Organempfängern und Patienten nach KMT die unter starker Immunsuppression stehen, ist dieses Risiko noch deutlicher erhöht und liegt sogar zwischen 10 % (47, 197) und 27% (150). Alternativ werden zurzeit entweder weitere Nukleosidanaloga (Cidofovir, Penciclovir, Valaciclovir, Brivudin) oder direkte Inhibitoren der viralen DNA-Polymerase (Foscarnet) eingesetzt. Sowohl bei Foscarnet als auch bei den alternativen Nukleosidanaloga stehen allerdings als schwere und unerwünschte Nebenwirkungen Nierenversagen, kardiale Problematiken und Knochenmarktoxizität im Vordergrund. Desweiteren wird insbesondere bei immunsupprimierten Patienten die zunehmende Ausbildung von multiresistenten Virusstämmen beobachtet (35, 48, 79, 137, 150).

1.1.10. Stand der Impfstoffentwicklung zur Prophylaxe von HSV-1/HSV-2-Infektionen

Trotz zahlreicher Bemühungen konnte bisher kein wirksamer Impfstoff gegen Herpes Simplex Viren hergestellt werden (212). Eine Immunisierung mit attenuierten Viren oder rekombinant hergestellten Glykoproteinen gB und gD konnte bisher nur im Mausmodell und im Meerschweinchen erfolgreich induziert werden. Eine Protektion des Menschen vor einer HSV-Infektion konnte durch diese Impfstoffe jedoch nicht erreicht werden (114, 142, 198). Eine passive Immunisierung mit polyklonalen Immunglobulinen steht außer Frage, da dadurch zwar eine Neutralisation freier Viren induziert werden könnte, nicht aber die Inhibition des „cell-to-cell spreads“ (103). Die effektive Kontrolle von HSV-Reaktivierungen im Mensch ist daher aufgrund mangelnder Wirksamkeit neutralisierender Antikörper im Wesentlichen auf die zelluläre Immunantwort zurück zu führen (29, 45, 117, 145). Mangels eines wirksamen Impfstoffes und der zunehmenden Ausbildung von Virustatika ist eine Entwicklung von alternativen Therapeutika dringend notwendig.

1.2. Therapeutische Antikörper

1.2.1. Übersicht klinisch eingesetzter antiviraler Antikörper

Der Einsatz von Antikörpern zur Prävention und Therapie von Infektionskrankheiten geht auf die Pionierarbeiten von Robert Koch zurück, der im Jahre 1890 durch Applikation von Antiserum das Überleben eines an Diphtherie erkrankten Mädchens gesichert hat (31). Die erste Antikörper-Applikation zur Abwehr eines viralen Erregers erfolgte 1907, als das Serum eines Spenders nach einer überstandenen Maserninfektion zur Prophylaxe von einer Neuinfektion benutzt worden ist (77). Im Laufe der Jahre nahm der klinische Einsatz von Antikörpern stetig zu. Seit den frühen 80-iger Jahren wurden Hyperimmunglobulin-Präparate aus Spenderplasmen hergestellt, um unter anderem Infektionen mit Zytomegalovirus (CMV), Hepatitis A Virus (HAV), Hepatitis B Virus (HBV) Respiratory-Syncytial-Virus (RSV) oder dem West Nil Virus (WNV) zu behandeln (2, 140, 207). Der entscheidende Nachteil von Hyperimmunglobulin-Präparaten ist deren geringer Anteil an virusspezifischen neutralisierenden Antikörpern, da polyklonale Präparate eine überwiegende Mehrzahl an Virus-unspezifischen, nicht-neutralisierenden Antikörpern beinhalten. Die Entwicklung der Hybridom-Technologie ermöglichte die Herstellung von B-Zell-Myelom Hybridzellen, die murine, monoklonale Antikörper mit einer definierten Antigenspezifität sezernieren (120). Weiterentwicklungen in der rekombinanten Antikörpertechnologie führten schließlich zur Entwicklung von chimärisierten (22, 151) und humanisierten Antikörpern (105). Der humanisierte monoklonale Antikörper Palivizumab (Synagis®) wird beispielsweise zur Vorbeugung der durch das RSV hervorgerufenen schweren Erkrankung der unteren Atemwege eingesetzt (163, 196). Desweiteren wird zurzeit eine Vielzahl klinischer Studien zur Erprobung antiviraler Antikörper durchgeführt, die das enorme Potential von Antikörpern zur Behandlung von Infektionskrankheiten unterstreichen (140).

1.2.2. Wirkungsmechanismen antiviraler Antikörper

Antikörper können auf unterschiedliche Art ein Virus an der Infektion von Zellen hindern. Durch direkte Bindung an virale Oberflächenantigene können Antikörper die Adsorption freier Viren an korrespondierende zelluläre Rezeptoren blockieren (Abb. 4a) (186). Die Virus-Adsorption an die Zielzelle kann ebenso indirekt durch die Bindung von Antikörpern an zelluläre Rezeptoren verhindert werden (z.B. HIV). Die für das Virus essentiellen Rezeptor-Epitope werden durch den neutralisierenden Antikörper verdeckt und das Virus infolge einer sterischen Hinderung an der Adsorption an die Zelle entscheidend gestört (Abb. 4b) (127).

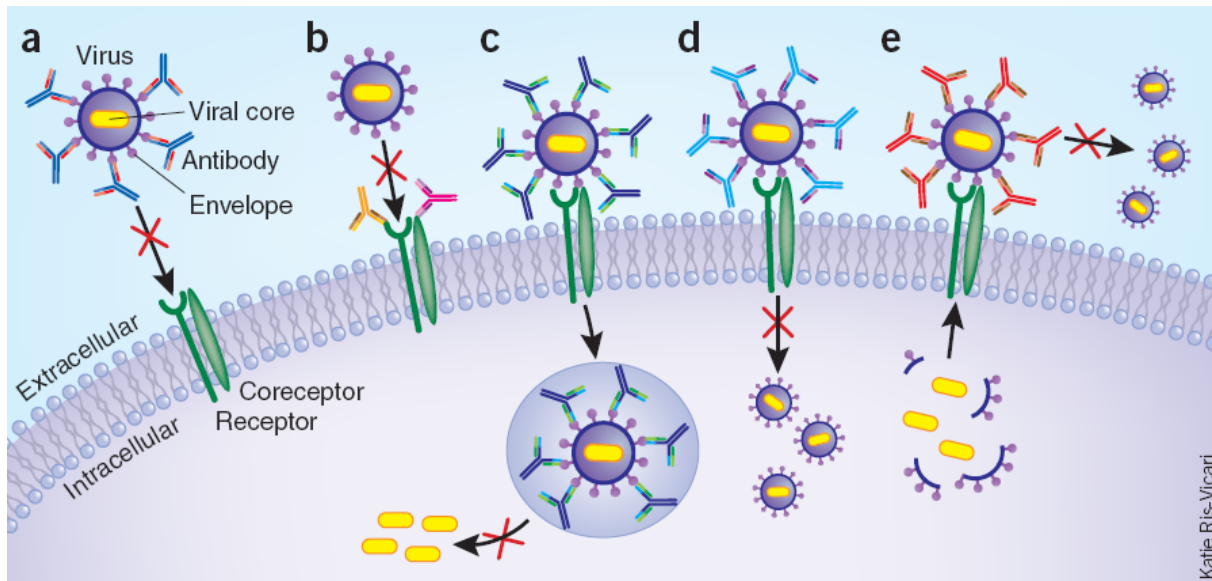


Abb. 4: Mechanismen der antikörpervermittelten Virusneutralisation (140). (a) Direkte Virusneutralisation durch Bindung von Antikörpern an virale Antigene. (b) Indirekte Virusneutralisation durch Induktion einer sterischen Hinderung nach Bindung von Antikörpern an zelluläre Rezeptoren. (c) Virusneutralisation durch antikörpervermittelte Inhibition der Freisetzung viraler Nukleokapside aus Endosomen (d) Hemmung der Virus-Penetration durch Inhibition der Fusion zwischen der Virushülle und der Zytoplasmamembran der Zielzelle. (e) Virusneutralisation durch Hemmung der Virus-Freisetzung aus der infizierten Zelle. Abbildung aus: Marasco *et. al.*, 2007 NATURE Biotechnology (140).

Viren, die eine Virushülle besitzen, können durch Endozytose unter Bildung eines Endosoms in die Zelle eindringen (z.B. Influenzaviren). Nach erfolgter Penetration der Zelle induziert der saure pH-Wert innerhalb des Endosoms eine Konformationsänderung der viralen Proteine und die damit verbundene Freisetzung des viralen Kapsids in das Zytoplasma (98). Antikörper können eine solche Konformationsänderung unterbinden und dadurch die für die virale Replikation essentielle Freisetzung des Kapsids in das Zytosol verhindern (Abb. 4c). Antikörper können das Eintreten des Virus in die Zielzelle auch nach der bereits erfolgten Virus-Adsorption verhindern. Nach der Bindung von umhüllten Viren an zelluläre Rezeptoren ist eine Konformationsänderung der viralen Proteine erforderlich, um die Membranfusion zwischen der Virus- und Zellmembran einzuleiten (27, 219). Antikörper können durch Bindung an virale Oberflächen-Proteine diese Konformationsänderung beeinträchtigen und das Virus am Eintritt in die Zelle hindern (Abb. 4d). Die Inhibition der Freisetzung von Nachkommen-Viren aus einer infizierten Zelle stellt einen weiteren Wirkungsmechanismus von Antikörpern dar (Abb. 4e). Die Viren verbleiben dadurch in der primär infizierten Zelle eingeschlossen und können keine weiteren Zellen infizieren (210). Neben den beschriebenen Mechanismen können Antikörper auch durch direkte Interaktion mit dem Virus eine Aggregation initiieren, und auf diese Weise die Infektivität signifikant reduzieren (140).

1.2.3. Muriner monoklonaler Antikörper mAk 2c

Der murine monoklonale Antikörper (mAk) 2c wurde durch Immunisierung von Mäusen mit dem UV-inaktivierten HSV-1-Stamm 342 hv generiert (60, 61). Der mAk 2c weist eine ausgeprägte Virus-neutralisierende Aktivität *in vitro* auf und ist im Gegensatz zu humanen Antikörpern zur wirkungsvollen Inhibition des für HSV charakteristischen, direkten Wegs der Infektion von einer infizierten zur nichtinfizierten Nachbarzelle („cell-to-cell spread“) in der Lage (61). Der mAk 2c ist der Subklasse IgG2a zugehörig und erkennt ein gemeinsames, stark konserviertes Epitop auf dem Glykoproteins B (gB) von HSV-1 und HSV-2. Das gB ist in seiner trimeren Form auf der Virusoberfläche und auf der Oberfläche infizierter Zellen vorhanden (88). Bindungsstudien zeigten, dass mAk 2c ein diskontinuierliches Epitop erkennt (Eis *et. al.*, unveröffentlichte Daten) und mit gB in zwei Bereichen der Domäne I interagiert (Abb. 5) (88). Für die Bindung und Funktionalität des mAk 2c erwiesen sich die gB-Aminosäuren Y303-E305 als essentiell. Gentechnisch hergestellte Virusmutanten mit den Aminosäureaustauschen Y303N, R304Q und E305K entzogen sich zwar der Neutralisation durch mAk 2c, zeichneten sich jedoch durch eine drastisch reduzierte Infektivität aus (Eis *et. al.*, unveröffentlichte Daten). Darüber hinaus zeigt mAk 2c eine Wechselwirkung im Bereich der Aminosäuren F175-E184, der teilweise mit einer der beiden Fusionsschleifen in der Domäne I überlappt (Eis *et. al.*, unveröffentlichte Daten).

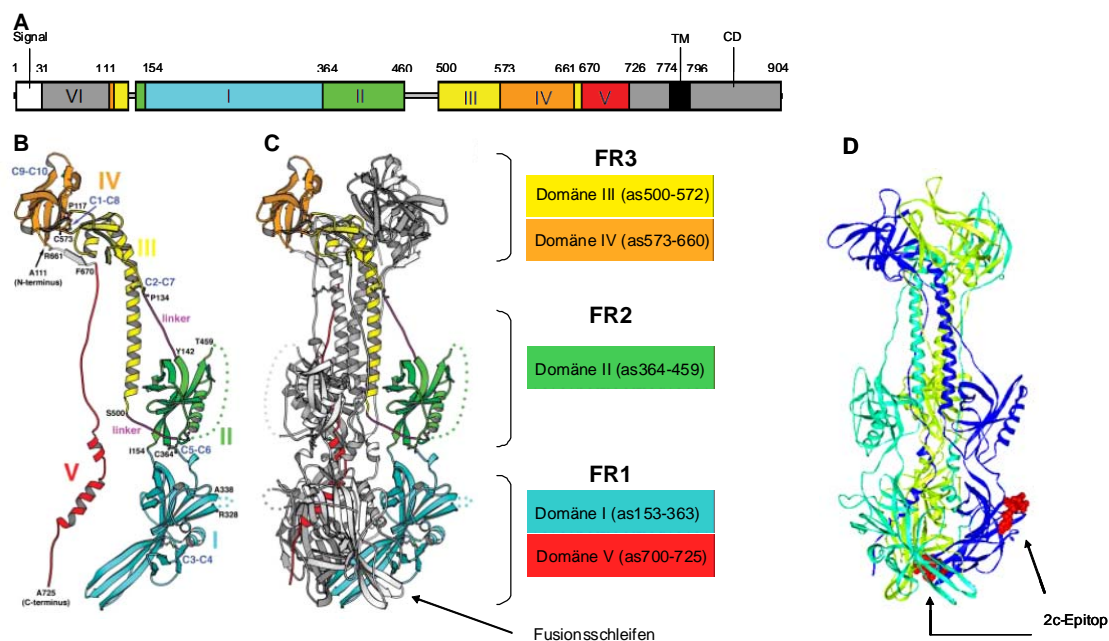


Abb. 5: HSV-1 Glykoprotein B. (A) Domain-Architektur des gB analog zu den durch Röntgenkristallographie bestimmten Struktur-Domänen. (B) Dreidimensionale Darstellung eines gB-Monomers in der Postfusionskonformation. (C) Dreidimensionale Darstellung der trimeren gB-Form. (D) Markierung der mAk 2c Bindungsstellen (F175-E184 und Y303-E305) (rot). FR1-3: Funktionelle Regionen (8); TM = Transmembrane Domäne; CD = Zytoplasmatische Domäne. Modifiziert nach: Heldwein *et. al.*, 2006 SCIENCE (88).

Die Untersuchungen im Mausmodell zeigten, dass die Gabe des mAk 2c bei sowohl immunkompetenten als auch immunsupprimierten ($CD4^+/CD8^-$) Versuchstieren die Virusvermehrung und das Entstehen entzündlicher Läsionen in der Vaginalschleimhaut innerhalb kurzer Zeit wirkungsvoll inhibiert und im Unterschied zu polyklonalem humanen HSV-Serum zur hocheffizienten Hemmung einer generalisierten, letal verlaufenden Erkrankung in der Lage ist (Abb. 6) (61).

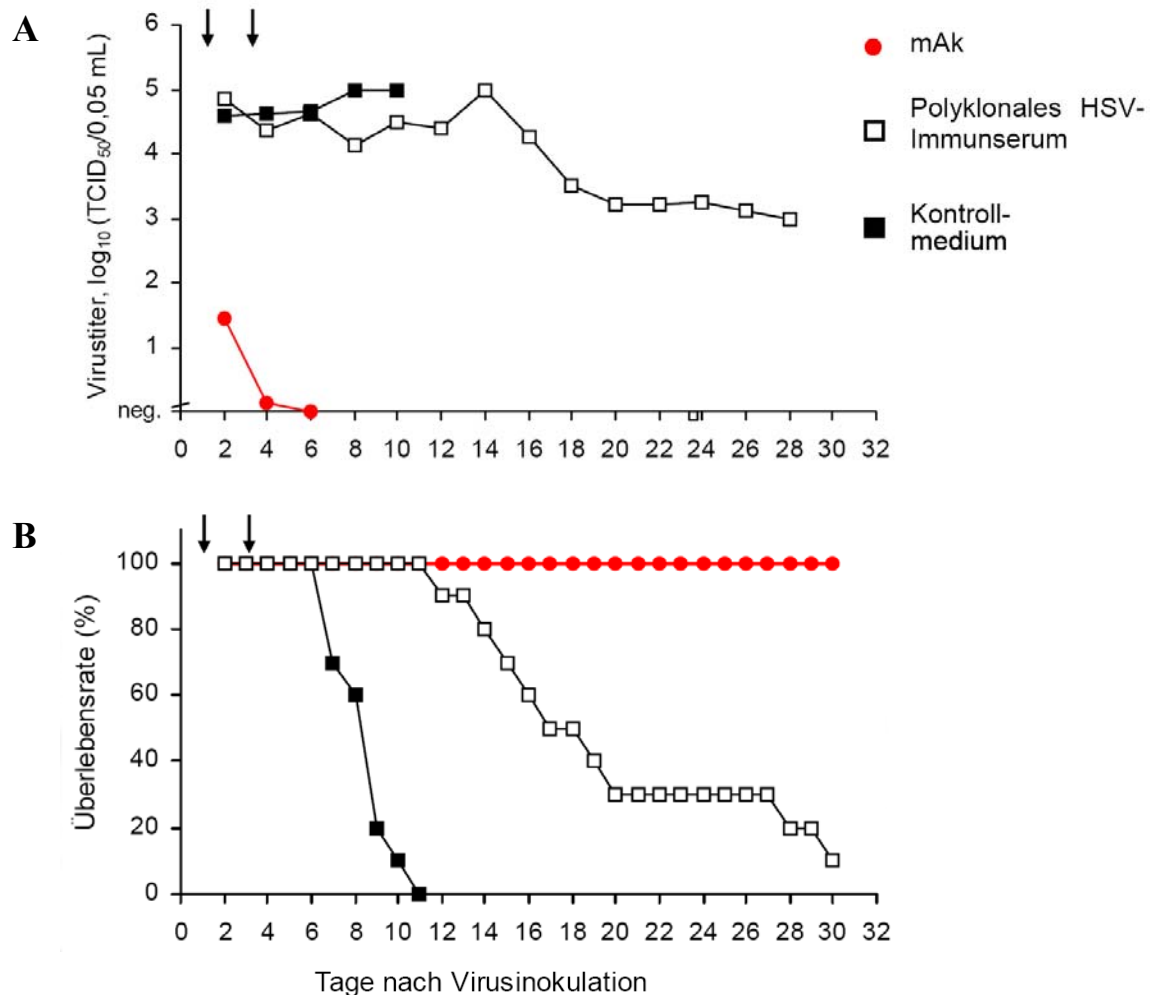


Abb. 6: Effekt des mAk 2c auf den Verlauf der HSV-Infektion bei immunsupprimierten ($CD4/CD8$) Mäusen. Die Infektion der Versuchstiere erfolgte durch Inokulation der Vaginalschleimhaut mit einer letalen Dosis von 1×10^6 TCID₅₀ HSV-1. Die postexpositionsprophylaktische Behandlung der infizierten Tiere erfolgte durch intraperitoneale Verabreichung von Kontrollmedium (schwarze Quadrate), polyklonalem humanen Serum (weiße Quadrate) oder mAk 2c (rote Kreise) 24 h und 72 h nach Infektion (Pfeile). **(A)** Quantifizierung der Viruslast in der Vaginalschleimhaut mittels Mikrotitration. Die Gabe von mAk 2c führte zu einer vollständigen Eradikation des Virus in der Vaginalschleimhaut. **(B)** Überlebenskurve. Der murine mAk 2c induziert im Gegensatz zu Kontrollmedium und polyklonalem humanen Serum einen wirksamen Schutz vor einem letalen Infektionsverlauf.

1.2.4. Molekulare Struktur und Funktion von Antikörpern

Die molekulare Struktur von Antikörpern wurde bereits Ende der sechziger Jahre aufgeklärt (46, 59). Antikörper bestehen aus Polypeptidketten unterschiedlicher Molekülgröße, die über kovalente und nicht-kovalente Bindungen miteinander in Verbindung stehen. Man unterscheidet dabei die leichte Kette (L) mit einer Größe von ca. 24 kDa von einer ca. 55 kDa großen schweren Kette (H). Die leichten Ketten sind jeweils durch eine intermolekulare Disulfidbrücke mit einer schweren Kette verbunden, während die schweren Ketten durch zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Die Beschaffenheit der schweren Kette bestimmt die Immunglobulinklasse. Bei Antikörpern der Immunglobulinklasse G (IgG) setzt sich die schwere Kette aus einer variablen und drei konstanten Domänen (C_{H1} - C_{H3}) zusammen. Die leichte Kette besteht aus einer variablen (V_L) und einer konstanten Domäne (C_L). Die variablen Ketten liegen N-Terminal und zeichnen sich im Unterschied zu konstanten Domänen durch eine hohe Sequenzvariabilität aus. Die variablen Domänen lassen sich weiter in weitgehend konservierte Regionen („framework-regions“ = FR) und hypervariable Regionen („Complementarity Determining Regions“ = CDRs) unterteilen (99, 106).

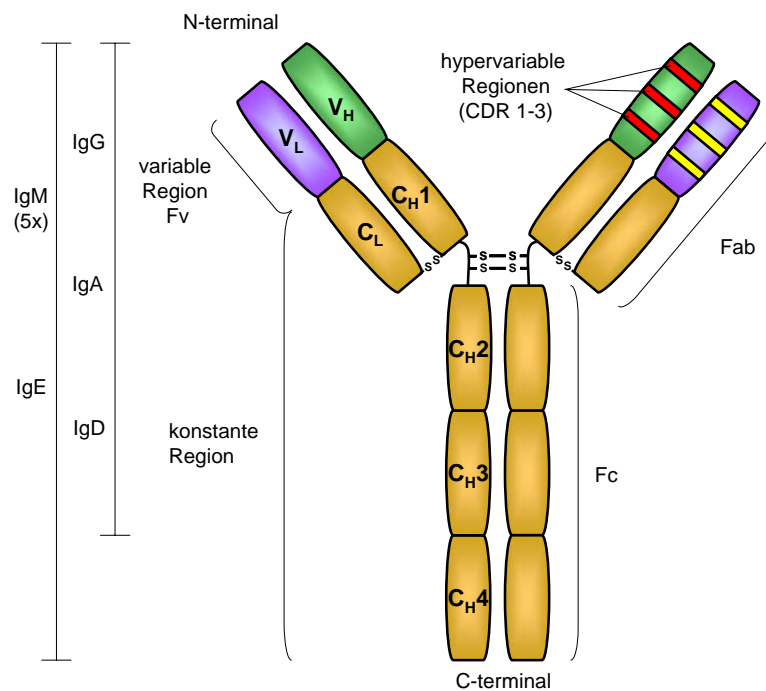


Abb. 7: Schematische Darstellung eines monomeren Ig-Moleküls. In Abhängigkeit von der Ig-Klasse setzen sich die konservierten Regionen der H-Ketten aus drei oder vier konstanten Domänen zusammen. Für die leichte Kette ist nur eine konstante Domäne bekannt. Die Antikörper der Klasse IgM setzen sich aus 5 monomeren Ig-Grundeinheiten zusammen, die durch im Fc-Abschnitt bindende Polypeptide vereinigt werden. IgA existiert sowohl in monomerer als auch in polymerer Form. Fc = fragment crystalline; Fv = fragment variable; Fab = fragment of antigen binding, V_H = variable Domäne der schweren Kette, V_L = variable Kette der leichten Domäne; C_L = konstante Region der leichten Kette; C_{H1-4} = konstante Regionen der schweren Kette. IgM, IgD, IgG, IgA, IgE = Immunglobulin-Isotypen.

Die Struktur der variablen Domänen konnte in den 70-iger Jahren mit Hilfe der Röntgenkristallographie entschlüsselt werden (162, 180). Die Untersuchungen zeigten, dass die FR-Domänen der leichten und schweren Kette jeweils ein Gerüst aus einer doppelten β -Faltblattstruktur bilden. Daraus erheben sich entsprechend jeweils drei Schleifen (CDR-Regionen), die gemeinsam die Antigenbindungsstelle (Paratop) des Antikörpers bilden (Abb. 7).

Beim Menschen lassen sich aufgrund der Struktur, Funktion und Verteilung im Gewebe fünf Immunglobulin-Klassen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) unterscheiden (Abb. 7). Die IgG-Klasse lässt sich weiterhin in die Subklassen IgG1, IgG2, IgG3 und IgG4 unterteilen. Die vier Subklassen weisen trotz einer 95%-igen Sequenzhomologie in der Aminosäuresequenz der Fc-Untereinheiten fundamentale Unterschiede in der Fähigkeit zur Aktivierung von Effektorfunktionen auf. Die Fc-Domänen der Antikörper können in Abhängigkeit von der Subklasse an Proteine des Komplementsystems oder an zelluläre Fc-Rezeptoren (Fc γ R) mit unterschiedlicher Affinität binden ($\text{IgG4} < \text{IgG2} < \text{IgG1} \leq \text{IgG3}$) und Effektorfunktionen vermitteln (Tab. 2). Die Aktivierung der antikörperabhängigen komplementvermittelten Zytotoxizität („complement dependent cytotoxicity“ = CDC) erfolgt durch Antikörper der Subklassen IgG1, IgG2 und IgG3 infolge von Bindung der C_H2-Domäne des Antikörpers an die Komplementuntereinheit C1q (58). Die Aktivierung von Effektorzellen erfolgt beim Menschen durch Bindung der Fc-Domäne eines Antikörpers in Abhängigkeit von der IgG-Subklasse an den hochaffinen Rezeptor Fc γ RI (CD64) oder einen der niedrigaffinen Rezeptoren Fc γ RIIa (CD32a) bzw. Fc γ RIII (CD16), die auf unterschiedlichen Effektorzellen exprimiert werden (Tab. 2) (166). Dadurch wird entweder die direkte Elimination des Infektionserregers mittels Phagozytose (Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen) oder die Lyse infizierter Zellen durch Aktivierung der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität („antibody dependent cellular cytotoxicity“ = ADCC) induziert (NK-Zellen). Desweiteren werden Antigene nach der Fc γ R-vermittelten Phagozytose auf der Oberfläche von dendritischen Zellen präsentiert und verstärken durch zusätzliche Stimulierung von CD4⁺ T-Helferzellen die Generation von CD8⁺ zytotoxischen T-Effektorzellen (52, 67, 108, 167). Eine Abschwächung der beschriebenen zellulären Effektorfunktionen erfolgt dagegen durch Bindung der IgG-Fc-Domäne an den Rezeptor Fc γ RIIb (CD32b) (21).

Tab. 2: Aktivierung von Effektorzellen durch Antikörper der IgG-Klasse. Die Affinitäten der Fc-Domänen zu Fc γ -Rezeptoren sind als hoch (+++), mittel (++) oder gering (+) klassifiziert. (-) = keine Bindung. NG = neutrophile Granulozyten, EG = eosinophile Granulozyten, DC = dendritische Zellen.

Fc γ R	Zelltyp	Funktion	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Fc γ RI	Monozyten, Makrophagen, NG, EG, DC	Phagozytose	++	-	+++	++
Fc γ RIIa Fc γ RIIb	Monozyten, Makrophagen, NG, EG, DC	Phagozytose	++	+	-	+
Fc γ RIII	NK-Zellen, Makrophagen, NG, EG, Mastzellen, DC	Zelllyse (ADCC)	+++	-	+++	-

Aus vollständigen IgG-Antikörpern lassen sich Antikörperfragmente unterschiedlicher Form generieren. Durch proteolytischen Verdau mit Papain lassen sich Fab- und mit Pepsin F(ab')₂-Antikörperfragmente generieren (Abb. 8). Ein Fab-Fragment besteht aus der leichten Kette (V_L + C_L) und den ersten beiden Domänen der schweren Kette (V_H + C_{H1}). Das F(ab')₂-Fragment entsteht durch Verknüpfung zweier Fab-Fragmente infolge der Ausbildung einer kovalenten Bindung zweier C-terminaler Cystein-Reste. Ein scFv-Antikörper kann gentechnisch hergestellt werden und besteht aus einer V_L und einer V_H Domäne die durch einen Peptidlinker kovalent miteinander verbunden sind (Abb. 8).

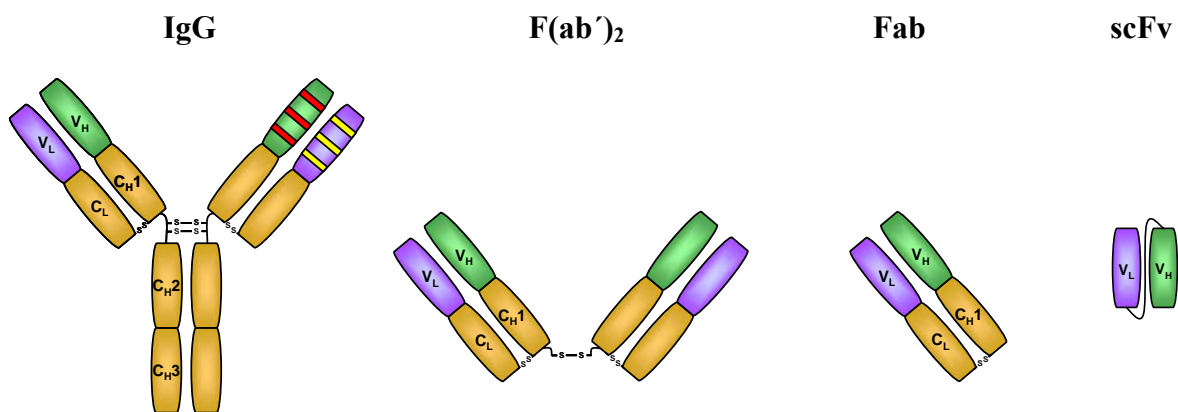


Abb. 8: Schematische Darstellung proteolytisch und gentechnisch hergestellter Antikörperfragmente. Mittels konventionellem Proteaseverdau vollständiger Antikörper der IgG-Klasse werden F(ab')₂-Fragmente und Fab-Fragmente hergestellt. Zur Generierung eines scFv-Antikörpers („single chain fragment variable“) werden die für die variablen Domänen V_H und V_L kodierenden Gene gentechnisch durch ein flexibles Verbindungs-Peptid (=“linker“) verbunden.

Die Antikörper-Valenz bezeichnet die Anzahl der Antigen-Determinanten, die von einem Antikörper spezifisch gebunden werden können. Bivalente IgG-Antikörper und F(ab')₂-Fragmente können an zwei Antigen-Epitope gleichzeitig binden, während monovalente Fab- und scFv-Fragmente nur eine Antigenbindung ausüben. Frühere Untersuchungen zeigten, dass die Antikörper-Valenz für eine effiziente Neutralisation von Viren wie z.B. das Sindbis-

Virus oder HIV entscheidend sein kann (32, 203). In beiden Fällen zeichneten sich bivalente Antikörper durch eine deutlich effizientere Virusneutralisation aus. Bei Herpes Simplex Viren ist bisher bekannt, dass Antikörper, die gegen ein Epitop auf dem gD-Antigen erkennen, das Virus bereits als monovalente Fab-Fragmente neutralisieren können (26). Der Einfluss der Valenz hinsichtlich der Neutralisationseffizienz von Antikörpern, die das gB-Antigen von Herpes Simplex Viren erkennen, wurde bislang noch nicht untersucht.

1.2.5. Nutzbarmachung muriner Antikörper durch Humanisierung

Während des natürlichen HSV-Infektionsverlaufes werden keine Antikörper mit vergleichbaren Eigenschaften wie denen des mAk 2c bezüglich der Neutralisation und der Inhibition des „cell-to-cell spreads“ gebildet. Da es sich bei dem anti-HSV Antikörper mAk 2c um einen murinen Antikörper handelt, würde bei der Applikation dieses Antikörpers im Mensch eine Immunantwort gegen diesen Antikörper ausgebildet werden (HAMA = „human anti mouse antibody“) (178). Darüber hinaus könnten schwerwiegende anaphylaktische Reaktionen induziert werden (123). Zur Nutzbarmachung muriner Antikörper beim Menschen kann deren Immunogenität mittels rekombinanter Antikörpertechnologie signifikant reduziert werden, um auf diese Weise einen gut verträglichen Antikörper zu generieren. Durch Austausch der murinen konstanten Domänen gegen humane lässt sich ein chimärer Antikörper herstellen, der zu 33% aus murinen und zu 67% aus humanen Aminosäuresequenzen besteht (Abb. 9A) (151). Weiterentwicklungen in der rekombinanten Antikörpertechnologie machten eine weitere Reduktion der Immunogenität muriner Antikörper mittels „Humanisierung“ möglich (105). Das Ziel einer Humanisierung ist eine Reduktion der für den Menschen immunogenen Eigenschaften des murinen Antikörpers bei einer gleichzeitigen Beibehaltung der neutralisierenden Eigenschaften. Um eine solche gentechnische Modifikation zu ermöglichen, werden die parentalen Gensequenzen der zur Antigenerkennung essentiellen hypervariablen Regionen („Complementarity Determining Regions“, CDRs) der schweren und der leichten Kette in zuvor aus Datenbanken selektionierte humane „Framework“-Keimbahnsequenzen mit einer größtmöglichen Sequenzhomologie zur murinen Sequenz gentechnisch „transplantiert“ („CDR grafting“) (Abb. 9B). Die Verwendung humaner Framework-Regionen der Keimbahn ist deshalb sinnvoll, um einen humanisierten mAk mit dem möglichst geringen immunogenen Potential zu generieren. Ein humanisierter Antikörper besteht damit zu 95% aus humanen und zu 5% aus murinen Sequenzen (10).

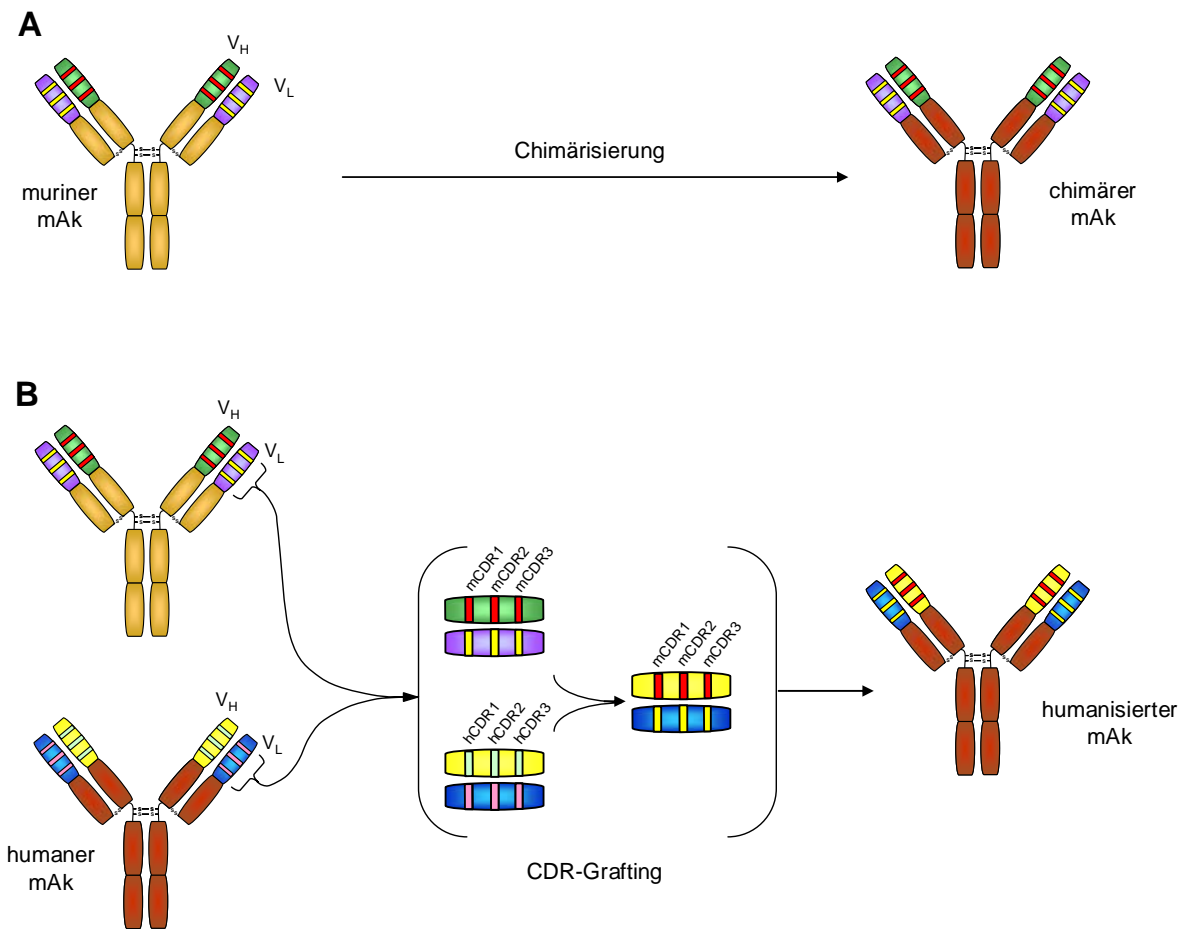


Abb. 9: Schematische Darstellung einer Antikörper-Chimärisierung bzw. Humanisierung.

(A) Chimärisierung: Durch Fusion muriner variabler Regionen ($V_H + V_L$) mit humanen konstanten Regionen (rot) wird ein chimärisierter Antikörper hergestellt.

(B) Humanisierung: Die Gentechnische Transplantation der murinen hypervariablen Regionen (mCDR) in humane Akzeptorgerüste führt zu einer maximal-möglichen Reduktion der immunogenen Eigenschaften und somit zur Humanisierung des murinen Antikörpers.

Die Humanisierung eines murinen Antikörpers durch alleiniges „CDR-Grafting“ führt zwar zur vollständigen Erhaltung der Antigenspezifität, ist jedoch oft mit einer drastischen Reduktion der Affinität assoziiert (105). Durch Sequenzabgleich der Aminosäuresequenzen von Antikörpern mit bekannter Tertiärstruktur können Aminosäuren im Bereich der Framework-Regionen der leichten Ketten bestimmt werden, die einen kritischen Einfluss auf die Konformation der Antigenbindungsschleifen haben (37, 38). Durch gezielte Mutagenisierung dieser Aminosäuren kann die ursprüngliche Affinität des Antikörpers und damit auch dessen Funktionalität vollständig wiederhergestellt werden (169, 170). Die auf diese Weise modifizierten humanisierten Antikörper stellen eine vielversprechende Alternative zur immunoprophylaktischen Behandlung von Infektionskrankheiten mit Hyperimmunglobulin-Präparaten dar. Neben dem sich bereits in klinischer Anwendung

befindenden humanisierten Antikörper Synagis® zur Behandlung von RSV-Infektionen wird derzeit eine Vielzahl humanisierter Antikörper mit der Spezifität gegenüber HIV, HCV, EBV und CMV in klinischen Phase 1 bzw. Phase 2 Studien erprobt (140). Einen wirksamen Antikörper zur Prophylaxe von Herpes Simplex Virusinfektionen bzw. zur Behandlung von rekurrenten Infektionen gibt es zurzeit nicht.

1.2.6. Das NOD/SCID-Mausmodell

Die bisher durchgeführten Untersuchungen im Mausmodell zeigen, dass die Gabe des mAk 2c bei sowohl immunkompetenten als auch immunsupprimierten (CD4⁺/CD8⁻) Versuchstieren zu einer Prävention der HSV-Infektion führt. In diesem Tiermodell sind jedoch weder das Komplementsystem noch die Effektorzellen (Makrophagen, NK-Zellen) ausgeschaltet (61). Dadurch lässt sich die Mitwirkung dieser Komponenten bei der Virusneutralisation nicht ausschließen. Um die alleinige Fähigkeit des humanisierten Antikörpers zur Prävention einer HSV-Infektion *in vivo* untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das NOD/SCID-Mausmodell verwendet. In diesem Modell ist die SCID-Mutation („Severe Combined Immunodeficiency“, schwerer kombinierter Immundefekt) mit dem NOD („Non-Obese Diabetic“, nicht-fettleibig-diabetisch)-Typ kombiniert. NOD/SCID-Mäuse zeichnen sich durch multiple Defekte des Immunsystems aus. Diese basiert auf einem Mangel an reifen B- und T-Zellen sowie einem Defizit an NK-Zell-Aktivität. Desweiteren besitzen NOD/SCID-Mäuse keine funktionell aktiven Makrophagen und kein einsatzfähiges Komplementsystem (132, 183).

1.3. Zielsetzung

Generalisierte Infektionen mit HSV-1 und HSV-2 sind insbesondere bei immunsupprimierten Patienten aufgrund zunehmender Resistenzentwicklung gegenüber den derzeit zur Verfügung stehenden Virustatika eine gefürchtete Komplikation, die mit einer hohen Mortalitätsrate assoziiert ist. Deshalb ist die Entwicklung von alternativen Therapeutika dringend erforderlich. Eine vielversprechende Alternative stellt der murine monoklonale Antikörper mAk 2c dar. Durch spezifische Bindung an ein hoch konserviertes Epitop innerhalb des für die viralen Replikation essentiellen Glykoproteins B ist der mAk 2c zur hochwirksamen Virusneutralisation von HSV-1 und HSV-2 und zur Inhibition des „cell-to-cell spreads“ in der Lage. Da beim Menschen im Zuge einer natürlichen HSV-Infektion keine Antikörper dieser Spezifität gebildet werden, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mAk 2c als ein innovatives Therapiekonzept zur Prophylaxe und Therapie von Herpes Simplex Virus

Infektionen evaluiert werden. Zunächst sollte ein möglicher Einfluss der Antikörpervalenz (monovalent vs. bivalent) hinsichtlich der Bindungseigenschaften und der antiviralen Wirksamkeit des mAk 2c untersucht werden. Dazu sollten die Antikörperfragmente 2c-Fab, 2c-F(ab')₂ und mAk 2c-scFv produziert, protein-biochemisch aufgereinigt und anschließend im Bezug auf Affinität, Stabilität, Neutralisationseffizienz sowie Inhibition der Virusausbreitung durch den "cell to cell spread" im direkten Vergleich mit dem parentalen mAk 2c *in vitro* untersucht werden.

Zur klinischen Nutzbarmachung des mAk 2c sollte anschließend die potentielle Immunogenität des murinen Antikörpers gegenüber dem Menschen durch Humanisierung reduziert werden. Im Zuge dieses Verfahrens sollten mehrere humanisierte Antikörper-Varianten im IgG-1 Format gentechnisch hergestellt, in Säugerzellen produziert und analog dem parentalen mAk 2c funktionell charakterisiert werden. Die humanisierte Variante mit den vorteilhaftesten *in vitro*-Eigenschaften sollte schließlich im direkten Vergleich mit dem parentalen mAk 2c im NOD/SCID-Mausmodell hinsichtlich der Fähigkeit zur Eliminierung einer ansonsten letal verlaufenden HSV-Infektion untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborausstattung

Bakterienschüttler	Oehmen Labortechnik
Dot-Blot Apparatur	Schleicher & Schuell
Elektrophorese-Kammer <i>XCell SureLock</i>	Invitrogen
Elektrophorese-Kammern	Biorad, PeqLab
Elektrophorese-Netzgeräte	Biometra, Biorad
Elektroporationsgerät <i>Gene Pulser</i>	Biorad
ELISA-System GENios Plus	Tecan
FACS Calibur	Becton Dickinson
FACS LSR II	Becton Dickinson
FPLC-System AKTA	Amersham Biosciences
LAS-3000 Imaging System	Fujifilm
Geldokumentationskammer <i>GeneGenius</i>	Synergene
Hera Safe Sterilbank	Kendro GmbH
Heraeus CO ₂ Inkubator	Kendro GmbH
Inversionsmikroskop Nikon TMS	Nikon
Konfokalmikroskop	Leica DM IRE2
Kühlschrank <i>Comfort</i>	Liebherr
Lichtmikroskop Carl Zeiss	Zeiss
Mikrowellenherd	Severin
Einfriersystem Mr. Frosty	Nalgene
PCR System <i>Light Cycler</i>	Roche Diagnostics
pH-Meter <i>MP220</i>	MettlerToledo
Photometer <i>NanoDrop1000</i>	PeqLab
Pipetten	Eppendorf, Gilson
Pipettierhilfe <i>Pipettus</i> [®]	Hirschmann Laborgeräte
Plattformschüttler <i>Duomax 1030</i>	Heidolph
Roboter <i>MagNA Pure LC</i> (DNA-Isolierung)	Roche Diagnostics
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Amersham Bioscience
Semi-Dry Transferkammer	Biorad

Spektralphotometer *Gene Quant pro*
 Thermocycler *T3000*
 Thermomixer *ThermoStatplus*
 UV-Tisch *FLX-20M*
 Vortexer *Vortex Genie2*
 Waagen
 Wasserbad
Xcell SureLock Minicell SDS-Gel-Kammer
 Zählkammer (Neubauer)

Amersham Bioscience
 Biometra
 Eppendorf
 MWG-Biotech
 Scientific Industries
 Sartorius AG
 Julabo
 Invitrogen
 Oehmen Labortechnik

Zentrifugen

Avanti J-26 XP
 Tischzentrifuge 5415 R
 Tischzentrifuge 5415 D
 Heraeus Megafuge 1.0 R
 Heraeus Multifuge 3 LR

Beckmann Coulter
 Eppendorf
 Eppendorf
 Kendro GmbH
 Kendro GmbH

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Amicon® Ultra-15 Zentrifugaleinheit/Konzentrator
 (MWCO = 10.000 bzw. 30.000)
 Deckgläser rund, 12 mm
 Dialyse-Kassette *Slide-A-Lyzer* (10,000 MWCO)
 (0,5 – 3 ml Kapazität)
 Dialysemembran *Spectra/Por*® (6-8000 MWCO)
 Elektroporationsküvetten
 FACS-Röhrchen
 Light Cycler Kapillaren
 Mullkompressen
 Natrium-heparinisierte Kapillarröhrchen
 Nitrocellulose-Membran
 Objektträger (76 x 26 mm)
 Parafilm
 Petrischalen
 Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml)

Millipore

 Roth
 Thermo Scientific

 Roth/Spectrumlabs
 BioRad Laboratories
 Falcon/Becton Dickenson
 Roche
 Beese
 NeoLab
 Amersham Lifesciences
 Engelbrecht
 American National Can
 Greiner Bio-One
 Greiner Bio-One

Pipettenspitzen (0,5-20 µl; 20-200µl; 200-1000 µl)	StarLab
Proteingele 4% - 20% Tris-Glycin	Invitrogen
Reagenzgläser	Assistent
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Skalpelle	Braun
Spitzbodenröhrchen	Falcon/Becton Dickenson
Sterilfilter 0,22 µm	Sartorius
Tris-Glycin Gele (4-20%)	Invitrogen
Vakuumfiltrationseinheiten □ 90 mm	Sartolab B
Whatmanpapier	Biorad
Zellkulturflaschen (T25; T75; T175)	Greiner Bio-One
Zellkulturplatten (6-Loch; 24-Loch; 96-Loch)	Greiner Bio-One
Zellsieb <i>Cell Strainer</i> (70 µm)	Becton Dickenson
Zentrifugeneinsätze	Nalgene, Corning

2.1.3. Chemikalien

2-Propanol	Fluka
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Thermo Scientific
5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- β-Galactosid (X-Gal)	Roth
Acrylamid 2K-Lösung 30%	AppliChem
Agar	Roth
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin Natriumsalz (Amp)	Roth
Bromphenolblau	Roth
Coomassie-Färbelösung	Invitrogen
Dimethylsulphoxid (DMSO)	Sigma
Dithioerythritol (DTE)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Essigsäure	Roth
Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Roth
Epiglu Haut- und Wundkleber	Meyer-Haake
Ethanol	Riedel-de Haën
Ethidiumbromidlösung 1%, 10 mg/ml	Roth

Glukose	Roth
Glycerol	Roth
Glycin	MP Biomedicals
Hefextrakt	Roth
HEPES-Saline	Roth
Imidazol	Fluka
IPTG	Qiagen
Isofluran	Delta Select GmbH
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Ketamin 50 mg/ml	Ceva Tiergesundheit GmbH
LB-Medium	Roth
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Riedel-de Haën
Methylmalonsäure	Roth
Milchpulver	Roth
Mowiol	Calbiochem
Nagellack	Essence Cosmetics
Natriumdodecylsulfat SDS (Pulver)	Roth
Natriumazid	Sigma
Natriumphosphat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Roth
Polyoxyethylensorbitanmonolaurate (Tween 20)	Roth
Protein-A Agarose	Thermo Scientific
Schwefelsäure, 1M	Roth
Salzsäure, 1M	Roth
Sucrose (D-+)-Saccharose)	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	MP Biomedicals
Trichloressigsäure (TCA)	Roth
Trypton	Roth
Xylazin 20 mg/ml	Bayer

2.1.4. Lösungen und Puffer

2-YT Medium	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl pH = 7
2-YT _{GA} Medium	2-YT Medium 100 µg/l Ampicillin 100 mM Glukose
2-YT _{SA} -Medium	2-YT Medium 100 µg/l Ampicillin 400 mM Sucrose
ELISA-Bindepuffer	100 mM Na ₂ HPO ₄ pH = 9.0
ELISA-Blockpuffer	PBS 10 % (v/v) FCS pH = 7,4
ELISA-Probenpuffer	PBS 10 % (v/v) FCS 0,05 % (w/v) Tween20 pH = 7,4
ELISA-Stopplösung	1 M H ₂ SO ₄
ELISA-Waschlösung	PBS 0,05 % (w/v) Tween20 pH = 7,4
FACS-Puffer	PBS 2 % FCS 0,01 % (w/v) Natriumazid

HEPES-Saline	25 mM HEPES 100 mM NaCl pH = 7,5
HEPES-Saline + Tween20	25 mM HEPES 100 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween20 pH = 7,5
Ligase-Puffer (10x)	60 mM Tris/HCl 6 mM MgCl ₂ 10 mM DTE pH = 7,6
MonoS-Startpuffer	20 mM Methylmalonsäure 100 mM NaCl pH = 5,5
PCR-Puffer (10x)	100 mM Tris/HCl (pH = 8,3) 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 0,1 % (w/v) autoklavierte Gelatine 100 mM β-Mercaptoethanol pH = 8,3
PP-Puffer	50 mM Tris/HCl 1 mM EDTA 20 % (w/v) Sucrose pH = 8
Protein-A Bindepuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 100 mM NaCl 10 mM EDTA pH = 7,4 (mAk 2c) pH = 8 (ch2c, hu2c V1-V4)

Protein-A Elutionspuffer	100 mM Glycin pH = 2,5
Protein-A Neutralisierungspuffer	1 M Tris/HCl pH = 7,5
SDS-Laufpuffer	0,192 M Glycin 25 mM Tris-Base 0,1 % (w/v) SDS pH = 8,8
SDS-Probenpuffer (2x)	0,16 M Tris/HCl 0,2 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerol 0,02 % (w/v) Bromphenolblau pH = 6,8
SDS-Probenpuffer (2x), reduzierend	SDS-Probenpuffer (2x) 0,2 % (v/v) β -Mercaptoethanol pH = 6,8
Semi-Dry-Blot Puffer	48 mM Tris-Base 38 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol 1,3 mM SDS pH = 9,4
SOB-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt 2 % (w/v) Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM $MgCl_2$ 10 mM $MgSO_4$ pH = 7

SOC-Medium	SOB-Medium 20 mM Glucose pH = 7
SP-Puffer	300 mM NaCl 50 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O pH = 8.0
SP-10 Puffer (IMAC-Dialysepuffer)	SP-Puffer 10 mM Imidazol pH = 8.0
SP-50 Puffer (IMAC-Waschpuffer)	SP-Puffer 50 mM Imidazol pH = 8.0
SP-100-500 Puffer (IMAC-Elutionspuffer)	SP-Puffer 100-500 mM Imidazol pH = 8.0
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris 5,71 % konz. Essigsäure 5 mM EDTA
TBS-Puffer (1x)	50 mM Tris-Base 150 mM NaCl pH = 8
Tris-NaCl-Tween20-Puffer (10x) (<i>TNT-Puffer</i>)	100 mM Tris/HCl 1,5 M NaCl 0,5 % (v/v) Tween 20 pH = 8
Western-Blot Blockpuffer	TNT-Puffer (1x) 2 % (w/v) Milchpulver

2.1.5. Reagenzien für die Zellkultur

β-Mercaptoethanol	GIBCO / Invitrogen
Dulbecco's PBS	GIBCO / Invitrogen
IMDM	GIBCO / Invitrogen
DMEM	GIBCO / Invitrogen
RPMI	GIBCO / Invitrogen
L-Glutamin 200 nM (100x)	GIBCO / Invitrogen
EX-Cell™ SP 2/0 Serumfrei	SAFC Biosciences
EX-Cell™ 620-HSF Serumfrei	SAFC Biosciences
Trypsin/EDTA (0,25 % Trypsin, 1 mM EDTA)	GIBCO / Invitrogen
Penizillin/Streptomycin (100x)	GIBCO / Invitrogen
GS-Supplement (1x)	SAFC

2.1.6. Kommerzielle Kits

Artus HSV-1 / HSV-2 LC PCR KIT	Qiagen
ECL Western Blotting Substrate	Pierce
Enzygnost Anti-HSV-IgG	DADE-Behring
Enzygnost supplementary reagents	DADE-Behring
HotStar HiFidelity PCR-Kit	Qiagen
ImmunoPure F(ab') ₂ Preparation Kit	Pierce
ImmunoPure Fab Preparation Kit	Pierce
Marathon™ cDNA Amplification Kit	BD Biosciences
Mycoplasma-PCR Test-Kit	AppliChem
Oligotex Direct mRNA Mini Kit	Qiagen
QIAmp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAprep Spin Maxiprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Midiprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen
Taq-DNA-Polymerase PCR Kit	Qiagen
TOPO®-TA-Cloning Kit	Invitrogen

2.1.7. Kommerzielle Reagenzien für die Molekularbiologie

SimplyBlue SafeStain™	Invitrogen
SDS-Laufpuffer, 10x	Roth
6 x DNA-Ladepuffer	Fermentas
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Protein-A-Agarose	Pierce
Novex IEF Anoden-Puffer (50x)	Invitrogen
Novex IEF Kathoden-Puffer (50x)	Invitrogen
Novex IEF Sample Buffer pH 3 – 10 (2x)	Invitrogen
Ultra TMB ELISA-Substrat	Thermo Scientific

2.1.8. Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden kommerziell bezogen. Alle Angaben sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 3: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide. Sequenzangabe in 5' → 3'-Orientierung. A: Adenosin, C: Cytosin, G: Guanosin, T: Thymin.

Amplifikation der mAk 2c V _H & V _L -Gene und Generierung des 2c-scFv		
Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'	Hersteller
CH1	GGCTGTTGTTTTGGCTGAGGAG	Invitrogen
C-κ-Maus	AGATGGATACAGTTGGT	Invitrogen
2c-V _H	TATACAGGTAAGTCTGAAAGAGTCTGGCCC	Invitrogen
2c-V _L	TATAGATGTTTTGATGACCCAACTCC	Invitrogen
2cVH#1-up	CAGGTAAGTCTGAAAGAGTCTGGCCC	Invitrogen
2cVH#2-do	TGAGGAGACGGTGACTGACG	Invitrogen
2cVH#3-up	TATACCATGGCGCAGGTAAGTCTGAAAG	Invitrogen
2cVH#4-do	AGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACCTG AGGAGACGGTGACT	Invitrogen
2cVL#1-up	GATGTTTTGATGACCCAACTCC	Invitrogen
2cVL#2-do	CCGTTTGATTTCAGCTTGGTGC	Invitrogen
2cVL#3-up	TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATC GGATGTTTTGATGACCC	Invitrogen
2cVL#4-do	TATAGGATCCCCGTTTGATTTCAGC	Invitrogen

Umklonierung des 2c-scFv in den Expressionsvektor pEE12

AK-S1	TATAGTGCACCTCGCAGGTAACCTCTG	Invitrogen
AK-AS1	TATAGGATCCCCGTTTGATTTC	Invitrogen

Sequenzierungsprimer

DP2	GCTAGCTTGAGGCATCAATA	MWG
pEE12S	GATAAGAGTCAGAGGTAAC	Invitrogen
pEE12AS	TCTTCCATACCTACCAGTTCT	Invitrogen
M13(-20)f	CTGGCCGTCGTTTTAC	MWG
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	MWG

Die Sequenz der zur quantitativen Bestimmung von HSV-1/2-Genomen verwendeten Primer aus dem Artus HSV-1 / HSV-2 LC PCR KIT kann nicht angegeben werden da es sich hierbei um ein patentiertes Betriebsgeheimnis der Firma Qiagen handelt und diese der Öffentlichkeit nicht zugänglich sind.

2.1.9. Standards

BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder	Invitrogen
DNA-Ladder 1 kb	Invitrogen
DNA-Ladder 100 bp	Invitrogen
GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
IEF Marker	Invitrogen
PeqGold Protein-Marker IV	PeqLab

2.1.10. Proteine

Zwei rekombinant hergestellte Varianten des HSV-1 Virusstammes KOS Glykoprotein B (gB), gB730 (88) und gB(724tHis) (15), wurden von Dr. Florent Bender (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt. Das Protein gB730 ist eine verkürzte Form des 904-Aminosäuren-langen Oberflächenantigens gB. Es besteht aus der extrazellulären Domäne im Bereich der Aminosäuren Ala³¹ bis Ala⁷³⁰. Die rekombinante Variante gB(724tHis) ist eine modifizierte Form des Proteins gB730. Sie besteht aus der Aminosäuresequenz Ala³¹ bis His⁷²⁴ und enthält zusätzlich 5 weitere Histidin-Reste am C-terminalen Ende. Beide Varianten wurden in PBS gelöst und bei -80°C gelagert.

2.1.11. Antikörper

Zur Detektion von an das gB-Antigen gebundenen Antikörpern mAk 2c, ch2c, hu2c V1-V4 und der Antikörperfragmente 2c-F(ab')₂, 2c-Fab und 2c-scFv wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Tab. 4: In der Durchflusszytometrie verwendete Detektionsantikörper.

Antikörper	Konjugation	Artikel-Nr.	Hersteller
Kaninchen-anti-Mensch, Fcγ-spez. 1,5 mg/ml	FITC	309-095-008	JIR
Maus-anti-c-myc 9E10, 200 µg	xxx	1-667-149	Roche
Ziege-anti-Maus, Fcγ-spez. 1,5 mg/ml	FITC	115-095-008	JIR
Ziege-anti-Maus-F(ab') ₂ -spez. 1,5 mg/ml	FITC	115-095-006	JIR
Ziege-anti-Mensch, Fcγ-spez. 1,5 mg/ml	FITC	109-096-008	JIR
Ziege-anti-Mensch, Fcγ-spez. 1,5 mg/ml	FITC	109-095-008	JIR

Tab. 5: Im Westernblot, ELISA und in der Immunhistochemie eingesetzte Antikörper.

Antikörper	Konjugation	Artikel-Nr.	Hersteller
H126, Maus-anti-HSV-gB (154), 1 mg/ml	xxx	NB110-57339	Novus Biol.
H1817, Maus-anti-HSV-gB (33), 1 mg/ml	xxx	NB110-57332	Novus Biol.
Kaninchen-anti-Mensch, F(ab') ₂ -Fragment, Fcγ-spez.	HRP	Kit Enzygnost Anti-HSV/IgG	DADE- Behring
Ratte-anti-Maus, IL-2-spez.		JES6-5H4	BD
Ratte-anti-Maus, IL-2-spez.	Biotin	JES6-1A12	BD
Synagis	xxx	Synagis	Abbott GmbH
Ziege-anti-HSV, polyklonal (gerichtet gegen das SQPELAPEDPED-Epitop auf dem Glykoproteins gD)	FITC	A190-136F	BETHYL
Ziege-anti-Maus, F(ab') ₂ -spez., 2,4 mg/ml	xxx	115-005-006	JIR
Ziege-anti-Maus, Fab-spez. polyklonal	HRP	A90-100P	BETHYL
Ziege-anti-Maus, Fcγ-spez. polyklonal	HRP	83100	QED
Ziege-anti-Maus, leichte Kette Kappa (κ)-spez. Polyklonal	HRP	A90-119P	BETHYL

Tab. 6: Sonstige im Rahmen der Arbeit eingesetzten Antikörper.

Antikörper	Konjugation	Artikel-Nr.	Hersteller
Synagis (spezifisch gegen RSV)	keine	639156	Abbott
Cytotect (polyklonales anti-HCMV-IgG)	keine	1469325	Biotest Pharma
Intratect (polyklonales humanes IgG)	keine	3433780	Biotest Pharma

2.1.12. Immunseren

Das als Komplementquelle verwendete, IgG-depletierte Serum eines auf HSV-spezifische Antikörper negativ getesteten Spenders wurde freundlicherweise von Prof. Hengel (Universitätsklinikum Düsseldorf, Abteilung für Virologie) zur Verfügung gestellt.

Polyklonales, HSV-neutralisierendes humanes Serum wurde durch das Poolen von Patientenseren mit einem nachweislich hohen Titer an HSV-spezifischen Antikörpern generiert. Die Proben wurden freundlicherweise von der diagnostischen Abteilung des Instituts für Virologie, Universitätsklinikum Essen, zur Verfügung gestellt.

2.1.13. Enzyme

CIP	Boehringer Mannheim
Expand TM High Fidelity PCR-System	Boehringer Mannheim
HotStar HiFidelity DNA-Polymerase	Qiagen
Streptavidin-Peroxidase (POD)	Dianova
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen
T4-DNA-Ligase	Boehringer Mannheim

Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffersysteme wurden, sofern nicht anders vermerkt, von der Firma New England BioLabs (NEB) bezogen.

2.1.14. Vektoren

2.1.14.1. pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO

Die pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO TA-Klonierungsvektoren (Invitrogen) werden für die Klonierung von *Taq*-Polymerase PCR-Produkten verwendet (2.2.1.11). Der pCR4-TOPO Vektor wurde von der Firma Entelechon für die Klonierung der humanisierten V_H- und V_L-Gensequenzen verwendet.

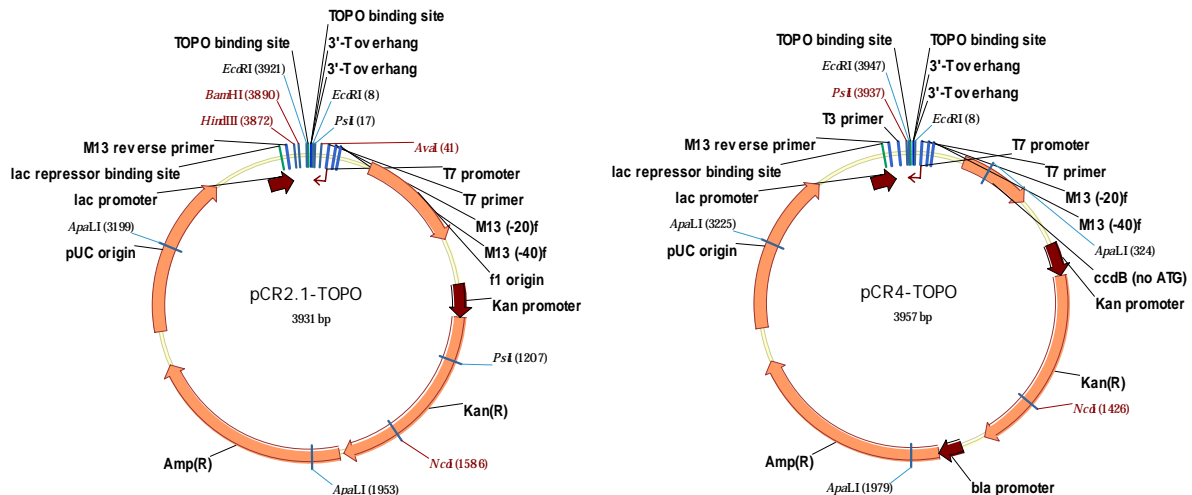


Abb. 10: TA-Klonierungsvektoren pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO (Invitrogen). Die Vektoren beinhalten T-Überhänge, an welche *Taq*-Polymerase PCR-Produkte (A-Überhänge) ligiert werden können. Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgene dienen der Selektion. Die in das β -Galactosidase-Gen integrierte Mehrfachklonierungsstelle ermöglicht Selektion mittels Blau-Weiß-Screening (2.2.1.16).

2.1.14.2. pHOG21

Zur Expression rekombinanter Antikörperfragmente im scFv-Format wurde der bakterielle Expressionsvektor pHOG21 verwendet (116). Dieser Vektor beinhaltet neben dem Ampicillin-Resistenzgen (beta-Lactamase) eine für das Signalpeptid PelB kodierende Sequenz der bakteriellen Pektatlyase aus *Erwinia carotovora*. Dieses Führungspeptid ist für die Regulation des Transportes der translatierten scFv-Konstrukte in das bakterielle Periplasma verantwortlich. Nach Integration des PelB-Signalpeptides in die Periplasmamembran der *E.coli* Bakterien erfolgt eine Abspaltung des scFv-Antikörpers von dem Signalpeptid durch das Enzym PelB-Peptidase und eine damit assoziierte Freisetzung in das Periplasma. Des Weiteren enthält der Vektor Sequenzen zur Kodierung des Proto-Oncogens *c-myc* (c-myc-tag) und des Hexahistidin-Komplexes (6xHis-tag). Der c-myc-tag wird durch den monoklonalen Antikörper 9E10 erkannt und dient zu Detektionszwecken. Zur Aufreinigung des scFv-Antikörpers mittels immobilisierter Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC) wird ein 6xHis-tag benötigt. Die Transkription wird

durch einen IPTG-induzierbaren lac-Promotor reguliert. Die Replikation des Vektor-Plasmids wird durch den „*origin of replication*“ Col E1 gesteuert.

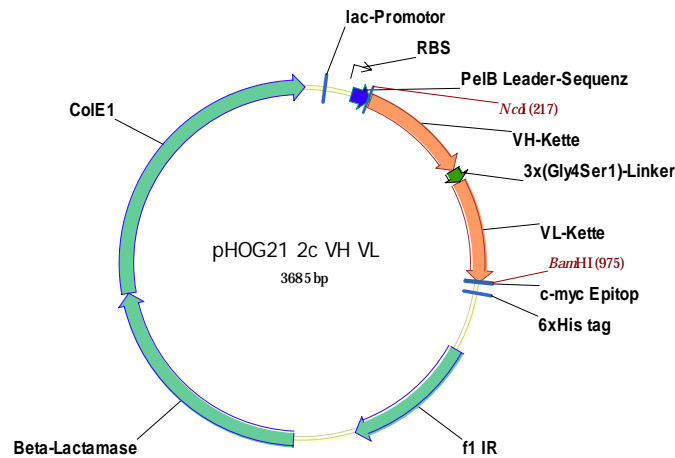


Abb. 11: Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsvektors *pHOG21*. Die V_H - und V_L -Gensegmente sind durch einen $(Gly_4Ser)_3$ -Linker miteinander kombiniert. Der 6xHis-tag dient der Aufreinigung, der c-myc-tag der Detektion des scFv-Antikörpers. Beta-Lactamase = Amp-Resistenzgen; f1 IR = „*intergenic region*“ RI, Verpackungssignal für Helferphagen (M13, R408); RBS = Ribosombindestelle; BamHI, NcoI = Restriktionsschnittstellen.

2.1.14.3. pEUC6B

Der Vektor pEUC6B basiert auf dem bakteriellen Expressionsvektor pHOG21. An Stelle der Sequenz für das PelB-Signalpeptid beinhaltet dieser Vektor die Gensequenz des Führungspeptides CD30, das zur Proteinexpression in Säugerzellen essenziell ist. Im Rahmen dieser Arbeit fungierte das pEUC6B-Plasmid als Zwischenklonierungs-Vektor verwendet, um die PelB-Signalpeptidsequenz gegen die CD30-Sequenz auszutauschen.

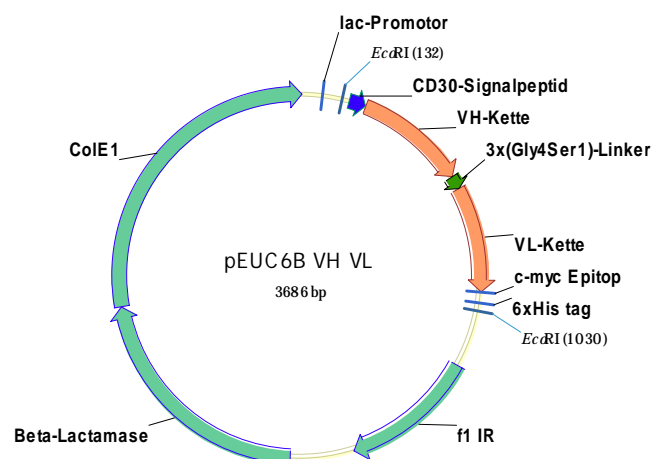


Abb. 12: Zwischenklonierungs-Vektor pEUC6B. Der scFv-Antikörper wurde an das für die eukaryotische Proteinexpression benötigte CD30-Signalpeptid gekoppelt. Beta-Lactamase = Ampicillin-Resistenzgen; f1 IR = „*intergenic region*“ RI, Verpackungssignal für Helferphagen (M13, R408); ApaLI, BamHI, NcoI = Restriktionsschnittstellen.

2.1.14.4. pEE12.1

Zur eukaryotischen Expression des scFv-Antikörpers wurde der pEE12.1 Vektor der Firma Lonza verwendet. Das Beta-Lactamase-Gen ermöglicht eine Ampicillin-Selektion in *E.coli* während der Plasmid-Amplifikation. Die Transkription des scFv-Antikörpergens wird durch den menschlichen Cytomegalovirus (HCMV) Enhancer gesteuert, der 5' zu der Mehrfachklonierungsstelle (MCS) liegt. Die Polyadenylierungssignalsequenz liegt 3' zu der MCS und zeigt die Terminierung der Transkription an. Des Weiteren beinhaltet der pEE12-Vektor ein Glutamin-Synthetase-cDNA-Gen, unter der transkriptionellen Kontrolle des SV40- Promotors. Die Glutamin-Synthetase (GS) erlaubt eine Selektion von Myelomzelltransfektanden in Glutamin-freiem Medium. Myelomzellen fehlt die Glutamin-Synthetase-Aktivität. Damit sind sie von einer externen Glutaminversorgung abhängig. Durch eine Transfektion mit dem pEE12-Vektor wird die Expression der GS induziert. Dadurch wird die Glutaminsynthese aus Glutamat eingeleitet und das Überleben der Zellen gewährleistet.

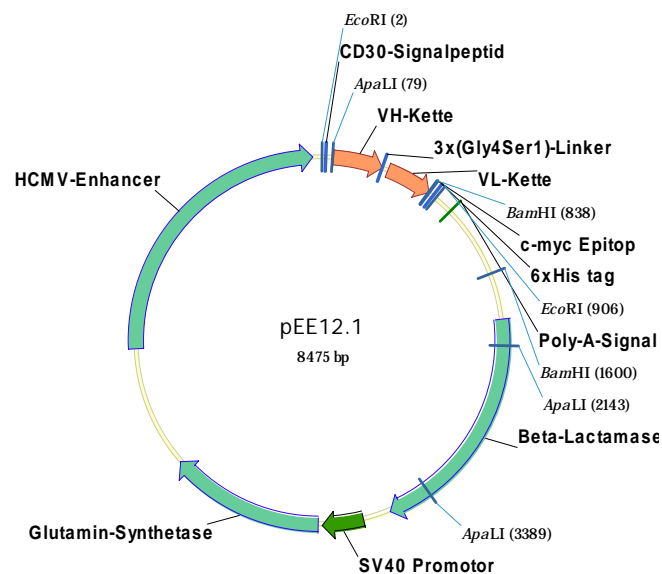


Abb. 13: Expressionsvektor pEE12.1 für Proteinexpression in eukaryotischen Myelomzellen. Die durch den SV40-Promotor kontrollierte Glutamin-Synthetase ermöglicht Selektion in glutaminfreiem Medium. Die Transkription des scFv-Gens wird durch den HCMV-Enhancer kontrolliert. Das CD30-Signalpeptid wird für die Proteinexpression in Säugerzellen benötigt. Poly-A-Signal = Polyadenylierungssignal; EcoRI = Restriktionsschnittstelle

2.1.15. Zelllinien

2.1.15.1. Vero-Zelllinie

Die Vero-Zelllinie ist eine etablierte Zelllinie, die aus normalen Nierenzellen von Grünen Meerkatzen gewonnen wurde (214).

2.1.15.2. 2c-Hybridom-Zelllinie

Die für die Produktion des murinen Antikörpers verwendete 2c-Hybridom-Zelllinie wurde von Prof. Dr. A-M. Eis-Hübinger (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt. Diese Hybridom-Zelllinie, wurde durch Polyethylenglykol-induzierte Fusion von Myelomzellen der Linie X63-Ag8.653 mit Milzlymphozyten von BALB/c-Mäusen, die mit dem UV-inaktivierten HSV-1-Stamm 342 hv immunisiert worden waren, hergestellt worden ist (60).

2.1.15.3. SP2/0-Ag14 Zelllinie

Die SP2/0-Ag14 Zelllinie wurde durch Polyethylenglykol-induzierte Fusion von BALB/c-Maus-Milzzellen mit der P3X63Ag8 Myelom-Zelllinie generiert (182). Die SP2/0 Zelllinie selbst produziert keine Antikörper, wurde jedoch mit Schwereketten- und Leichtketten-Plasmiden transfiziert um jeweils die Produktion der monoklonalen Antikörper ch2c und der humanisierten Varianten hu2c V1-V4 zu ermöglichen. Die mit entsprechenden Expressionsplasmiden transfizierte SP2/0-Ag14 Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Ludger Grosse-Hovest (Universität Tübingen, Abteilung für Immunologie, Tübingen) zur Verfügung gestellt.

2.1.15.4. NSO-Zelllinie

Zur Produktion des rekombinanten scFv-Antikörpers wurde die murine Myelom-Zelllinie NSO verwendet (75). Bei dieser Zelllinie ist die endogene Glutamin-Synthetase (GS) Aktivität auf ein Minimum reduziert, weshalb eine externe L-Glutamin-Versorgung für das Überleben der Zellen essenziell ist (13).

2.1.16. Bakterien

Für die Transformation von Ligationen und für die Amplifikation von Plasmid-DNA kamen TOP 10 One Shot™ der Firma Invitrogen und *E.coli* XL1-Blue der Firma Stratagene zum Einsatz. Für die Produktion des rekombinanten scFv-Antikörpers wurde der Bakterienstamm *E.coli* TG1 verwendet.

Tab. 7: Genotyp der verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Genotyp
TOP 10 One Shot™ (chemisch kompetent)	F' <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> λ-
XL1-Blue (elektro-kompetent)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ <i>M15</i> Tn10 (Tetr)]
TG1 (elektro-kompetent)	<i>supE thi-1</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) Δ(<i>mcrB-hsdSM</i>)5 (rK – mK –) [F' <i>traD36 proAB lacIqZ</i> Δ <i>M15</i>]

2.1.17. Viren

2.1.17.1. Laborstämme

Die Laborstämme HSV-1 F (63), HSV-1 F Δ*gE*, HSV-1 F rev (53) und HSV 17 syn⁺ (23) wurden freundlicher Weise von Prof. Hengel (Universitätsklinikum Düsseldorf, Abteilung für Virologie) zur Verfügung gestellt. HSV-2 Stamm G (50), HSV-1 342 hv (60) und HSV-1 TK⁻ (68) wurden von Prof. Eis-Hübinger (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt.

2.1.17.2. Klinische Virusisolate

HSV-positive, nicht auf mögliche Resistenz untersuchte klinische Virusisolate wurden freundlicher Weise von der diagnostischen Abteilung des Institutes für Virologie des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt. Die Serotyp-Bestimmung (HSV-1 / HSV-2) wurde von Prof. Eis-Huebinger (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn) durchgeführt. Klinische Virusisolate mit bekannten Resistenzen gegenüber Aciclovir- (ACV), Foscarnet- (PFA), Cidofovir- (CDV) wurden freundlicher Weise von Prof. Mertens (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Ulm) zur Verfügung gestellt. In beiden Fällen handelte es sich um vollständig anonymisierte Patientenproben, die keinerlei Rückschlüsse auf die Patienten zulassen. Ein entsprechendes Ethikvotum der Ethik-Kommission der Universität Duisburg-Essen liegt vor.

2.1.18. Computerprogramme und Internetseiten

AGOWA (DNA-Sequenzierung)	http://www.agowa.de
Antibody Engineering lab manual	http://www.bioinf.org.uk/abs/
BioEdit	Ibis BioSciences
CellQuest Pro	Becton Dickenson
FACSDiva	Becton Dickenson
Graphpad Prism 5.0	Graphpad Software
LAS-3000 Software	Fujifilm
Light Cycler Software 3.5	Roche
Magellan TM Data Analysis Software	Tekan
Microsoft Office	Microsoft
NCBI Homepage	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
The Kabat Database	http://www.kabatdatabase.com
Unicorn FPLC-Software	Amersham Biosciences
VBASE	http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/
VectorNTI 10.0	Informax

2.1.19. Versuchstiere

2.1.19.1. Das NOD/SCID-Mausmodell

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung der Wirksamkeit des humanisierten Antikörpers erfolgte im NOD/SCID-Mausmodell (NOD.CB17-*Prkdc^{scid}* /J; Charles River Germany, Sulzfeld). Bei den Versuchstieren handelte es sich um 4-5 Wochen alte weibliche Mäuse, die aus einer speziell pathogenfreien (SPF) Tierzuchtanlage stammen. Die Mäuse wurden für die Dauer der Versuche unter SPF-Bedingungen gehalten und hatten durchgehend freien Zugang zu Trinkwasser und Standard-Futter. Die Durchführung der Tierexperimente erfolgte gemäß den Richtlinien der „Federation of European Laboratory Animal Science Association“. Die Haltung der Mäuse erfolgte unter tierärztlicher Kontrolle am Universitätsklinikum Essen.

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (174) ist eine Methode zur Amplifikation definierter DNA-Bereiche mit Hilfe der DNA-Polymerase. Die PCR beruht auf der zyklischen Wiederholung der folgenden Schritte:

1. Denaturierung
2. Hybridisierung
3. Polymerisation

Die Durchführung erfolgte nach dem folgenden Protokoll:

Tab. 8: Allgemeines PCR-Protokoll zur Amplifikation doppelsträngiger DNA

	Zeit	Temperatur
Initiale Aktivierung PCR (10-40 Zyklen)	5 min	95°C
Denaturierung	30 sec	94°C
Hybridisierung	1 min	50-68°C
Polymerisation	1 min/kb	72°C
Finale Hybridisierung	10 min	72°C
Ende	∞	4°C

Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte soweit nicht anders vermerkt in einem Reaktionsansatz mit 10-100 µg DNA, jeweils 25 pmol Primer, 25 µmol dNTPs, 5 µl 10 x PCR-Puffer und 0,75 µl DNA-Polymerase (High Fidelity Enzyme oder Taq-Polymerase). Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 50 µl.

2.2.1.2. Real-Time PCR

Die *Real-Time* PCR (RT-PCR) hat im Gegensatz zur herkömmlichen PCR den Vorteil, die DNA-Kopien in einer Probe während der Amplifikation zu quantifizieren. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Fluoreszenz-Messung des im Zuge der PCR in die doppelsträngige DNA interkalierten Farbstoffes SYBR-Green. Die Fluoreszenz nimmt während der DNA-Amplifikation proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Um die Quantifizierung zu

ermöglichen wird eine Standard-Konzentrationsreihe eingesetzt. Es handelt sich dabei um Plasmid-DNA, welche die während der PCR zu amplifizierende DNA-Sequenz enthält. Diese wird mit einer definierten Anzahl von Kopien (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 usw. Kopien/ μ l) eingesetzt. Die RT-PCR lässt sich in drei Phasen unterteilen: Startphase, exponentielle Phase und Sättigungsphase. In der Startphase der Amplifikation ist die Substrat-DNA Menge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit gering, dass sich DNA, Oligonukleotide und DNA-Polymerase treffen. In der exponentiellen Phase herrschen durch die ansteigende Anzahl der DNA-Kopien optimale Reaktionsbedingungen. Während der Sättigungsphase ist die Menge an Produkt-DNA annähernd auf ein Maximum angestiegen. Es kommt überwiegend zur Hybridisierung der Produktfragmente, während die Substrat-DNA verbraucht und die Polymerase und freien Nukleotide durch Hitze zerstört werden. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzsignale wird daher während der exponentiellen Phase vorgenommen. Als Grundlage für den Beginn der exponentiellen Phase dient der Ct-Wert (*Cycle Threshold*, Schwellenwert-Zyklus). Dieser beschreibt denjenigen Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant ansteigt. Durch Bildung möglicher unerwünschter Nebenprodukte wie etwa von Primer-Dimeren, kann es zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommen. Um dieses Problem zu bewältigen, wird im Anschluss an die DNA-Amplifikation eine Schmelzpunktanalyse der amplifizierten Produkte durchgeführt, um die Reinheit dieser zu untersuchen. Auf Grundlage dieser Daten lässt sich anschließend eine Messtemperatur festlegen, bei der ausschließlich die Fluoreszenz des gewünschten Produktes gemessen wird. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die DNA-Isolierung routinemäßig mit dem Roboter *MagNA Pure LC* der Firma Roche Diagnostics. Die Quantitative RT-PCR wurde mit dem *Light Cycler* PCR System der Firma Roche Diagnostics durchgeführt und mit der dazugehörigen *Light Cycler* Software 3.5 ausgewertet. Für die Ermittlung der Anzahl der genomischen DNA-Partikel in einer HSV-1 bzw. HSV-2 Probe mit einer definierten Anzahl an infektiösen Partikeln von 1×10^4 TCID₅₀ wurde das Artus HSV-1 / HSV-2 LC PCR KIT der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung dieser bereits etablierten Methode erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.3. Extraktion und Aufreinigung von mRNA aus der Hybridom-Zelllinie

Die Isolierung der mRNA aus der 2c-Hybridom-Zelllinie (60) erfolgte mit dem Oligotex Direct mRNA Mini Kit der Firma Qiagen. Das Prinzip dieses Isolierungsverfahrens basiert auf der Tatsache, dass die meisten eukaryotischen mRNA-Moleküle an deren 3'-Ende mit einem Homopolymer von 20-250 Adenosin-Nukleotiden enden. Die Isolierung dieser Poly-

A⁺-RNA Moleküle erfolgt durch Hybridisierung der Poly-A⁺-Enden der mRNA an Oligo-dT Primer. Diese Oligonukleotide sind durch kovalente Bindung an Latex-Kügelchen, die sich in entsprechenden Säulen befinden, immobilisiert. Die mRNA bindet unter Hochsalzbedingungen an die Oligo-dT Primer und kann von tRNA- und rRNA-Verunreinigungen befreit werden. Die Dissoziation der mRNA erfolgt unter Niedrigsalzbedingungen. Die Durchführung der Aufreinigungsschritte erfolgte entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

2.2.1.4. Amplifikation der mAk 2c V_H & V_L Sequenzen mit RACE-PCR

Für die Herstellung eines Antikörperfragmentes im scFv-Format und für die Humanisierung des parentalen Antikörpers 2c ist die Kenntnis der authentischen Sequenzen der variablen leichten (V_L) und variablen schweren Kette (V_H) unverzichtbar. Für die Ermittlung der authentischen 5'-Sequenzen der variablen Schwere- und Leichtkette des mAk 2c wurde das MarathonTM cDNA Amplification Kit der Firma BD-Biosciences verwendet. Die Methode basiert auf der Durchführung einer 5'RACE-(“Rapid Amplification of cDNA Ends”)-PCR (Abb.1). Nach Lyse von mAk 2c sezernierenden Myelom-Hybridomzellen, poly-A⁺-RNA-Isolierung (2.2.1.3) und Synthese doppelsträngiger cDNA wurde an die 5'-Enden der V_H- und V_L-kodierenden Gene jeweils eine Adaptersequenz als universale Anlagerungsstelle für einen 5'-Primer ligiert. Zur Amplifikation der authentischen V_H- und V_L-Sequenzen mittels RACE-PCR wurde als 5'-Primer der AP1-Primer verwendet, welcher eine Sequenz im Bereich des zuvor ligierten Adapters erkennt. Aus früheren Arbeiten war bekannt, dass der mAk 2c der Subklasse IgG2a angehört (Eis *et.al.*, unveröffentlichte Daten). Daher wurden die Sequenzen der 3'-Primer in der jeweils konservierten CH1-Region (Primer CH1) der schweren Kette bzw. Cκ-Region (Primer C-κ-Maus) der leichten Kette ausgewählt. Die authentischen V_H- und V_L-Gensequenzen wurden amplifiziert und die jeweiligen Amplifikationsprodukte nach Subklonierung mittels TOPO-TA-Klonierung (2.2.1.11) (184) sequenziert. Der gesamte Prozess wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

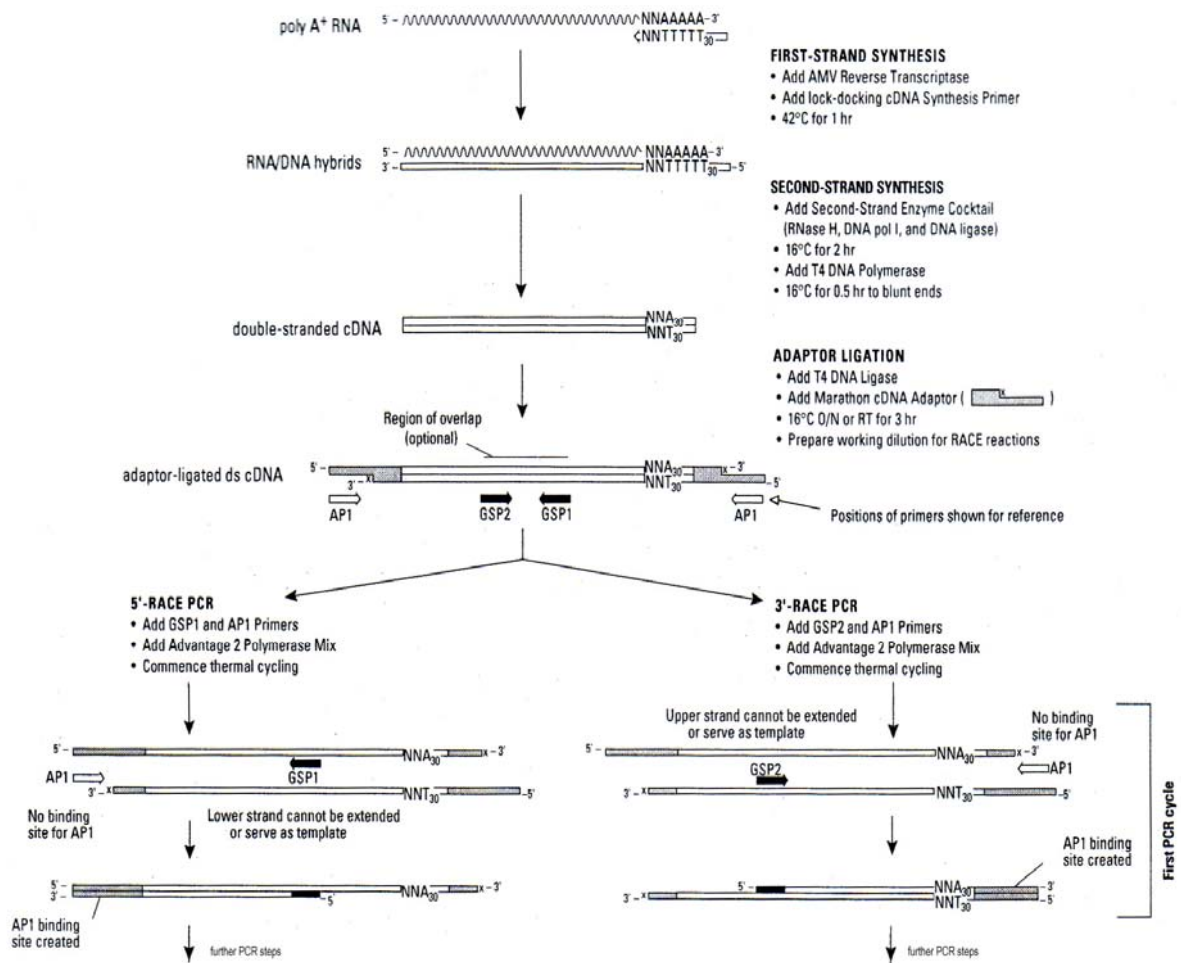


Abb. 14: Das Prinzip der RACE-PCR. Nach der Synthese der cDNA und Vervollständigung zur dsDNA erfolgt die Ligation des speziellen Adapters am 5'-Ende. Durch PCR-Amplifikation dieses Konstruktes mit dem Adapter-spezifischen Primer AP1 und einem Gen-spezifischen Primer ließ sich die authentische Sequenz der 5'-Region ermitteln.

2.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Zum Nachweis der Amplifikationsprodukte wurde die mittels PCR gewonnene DNA mit Ethidiumbromid gefärbt, in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht ausgewertet. Eine sichtbare Bande der erwarteten Länge wird nach Vergleich mit DNA-Längenstandards als positiv gewertet. Zur Präparation und Analyse von DNA-Fragmenten wurden 0,8-2%ige (w/v) TAE-Agarosegele gegossen. Die Agarosekonzentration wurde jeweils in Abhängigkeit von der Größe der DNA-Fragmente gewählt. Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in eine horizontale Gelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer versetzt und elektrophoretisch bei 100 V aufgetrennt (1 – 6 V/cm). Anschließend wurden die Gele auf

einer UV-Lichtplatte ($\lambda = 260\text{-}360\text{ nm}$) analysiert und in der Geldokumentationskammer *GeneGenius* aufgenommen.

2.2.1.6. Restriktionsspaltung von DNA

Doppelsträngige DNA wird mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen an meist palindromische Sequenzen spezifisch geschnitten. Die Simulation der Restriktionsspaltung erfolgte mit der Software Vector NTI. Als Berechnungsgrundlage zur Ermittlung der Enzymkonzentration gilt, dass 1 U eines Restriktionsenzym 1 μg Lambda-DNA mit einer Restriktionsschnittstelle bei 37°C in 1h vollständig schneidet. Auf dieser Annahme basiert folgende Gleichung:

$$\frac{bp_LambdaDNA * SS_Plasmid}{bp_Plasmid * SS_LambdaDNA} = Unit / \mu g_Plasmid$$

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die analytische Restriktionsspaltung in einem Volumen von 15 μl für die Dauer einer Stunde bei 37°C durchgeführt. Ein präparativer Restriktionsverdau wurde in einem Volumen von 5 $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ DNA für die Dauer von mindestens 4 Stunden durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

2.2.1.7. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die DNA-Banden wurden zunächst mit Hilfe eines Einmalskalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel-extraction Kits der Firma Qiagen nach Instruktionen des Herstellers.

2.2.1.8. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der DNA- bzw. RNA-Konzentration in einer Probe erfolgte mit Hilfe eines Spektralphotometers bei der Wellenlänge von $\lambda = 260\text{ nm}$. Für die dabei gemessene Extinktion gilt folgende Umrechnung:

RNA: $E_{260} = 1,0$ entspricht einer Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$

DNA: $E_{260} = 1,0$ entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Die Bestimmung der beiden anderen Extinktionswerte bei $\lambda = 280$ und $\lambda = 320\text{ nm}$ lässt auf die Reinheit der Nukleinsäure in der untersuchten Probe schließen. Proteinverunreinigungen

werden bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$ und Salzverunreinigungen bei einer Wellenlänge von $\lambda = 320 \text{ nm}$ nachgewiesen. Bei einer sauberen Nukleinsäurepräparation sollte das Verhältnis von E260/E280 im Bereich zwischen 1,7 – 1,8 für RNA bzw. 1,9 – 2,0 im Falle von DNA liegen. E320 sollte kleiner als 0,01 sein (176).

2.2.1.9. Dephosphorylierung von 5'-Enden der linearisierten Expressionsvektoren

Bei der Durchführung einer Ligation von Insert-DNA in Expressionsvektoren kommt es häufig zu einer Selbstligation des DNA-Vektors. Dadurch wird die Effizienz der Ligation reduziert. Um die Selbstligation zu verhindern, können mit Hilfe der CIP die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vektor-DNA abgespalten werden. Zu diesem Zweck wurden 5 μg linearisierte Plasmid-DNA zweimal mit 0,25 U CIP für 30 Minuten inkubiert. Die Inaktivierung der Phosphatase erfolgte im Anschluss durch Inkubation mit einer 0,5 mM EDTA-Lösung (Endkonzentration) für 20 Minuten.

2.2.1.10. Ligation von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren

Die T4-DNA-Ligase katalysiert unter Hydrolyse von ATP eine Phosphordiesterbindung zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe mit einer 5'-Phosphatgruppe. Durch diesen Prozess kommt es zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen zwei DNA-Fragmenten. Zur Durchführung einer Ligation wurden 100 ng linearisierter und 5'-dephosphorylierter (siehe 2.2.1.6) Plasmid-DNA zusammen mit dem dreifachen molaren Überschuss an Insert-DNA und 1 U T4-DNA-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20 μl bei 16°C in Ligase-Puffer über Nacht inkubiert. Das Ligationsprodukt wurde anschließend für die Transformation in kompetente Bakterien verwendet.

2.2.1.11. TOPO-TA-Klonierung

TOPO-TA-Klonierung ist eine effiziente Methode zu Subklonierung von PCR-Produkten in spezielle Sequenzierungsvektoren. Durch eine spezielle Aktivität der Taq-Polymerase werden einzelne Desoxyadenosinmonophosphate an das 3'-Ende der PCR-Produkte angefügt (24). Der in diesem Ansatz verwendete linearisierte Vektor pCR 2.1 TOPO besitzt an seinen 5'-Enden einzelne Desoxythymidinreste, die kovalent mit einer DNA-Topoisomerase verknüpft sind und somit eine effiziente Ligation mit den PCR-Produkten ermöglichen. Die Klonierung wurde mit dem TOPO[®]-TA-Cloning Kit der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die DNA-Fragmente in den pCR2.1 TOPO-Vektor ligiert. Die

Transformation der TOP 10 One Shot™-Zellen mit anschließender Blau-Weiß-Selektion erfolgte ebenfalls nach den Angaben des Herstellers. Zehn ausgewählte weiße Klone wurden in 5 ml 2YT-Medium mit 100µg/ml Ampicillin überführt. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Plasmide mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit isoliert. Im Anschluss wurde eine Kontrollrestriktion durchgeführt. Plasmid-DNA von positiven Klonen, welche im Zuge der Kontrollrestriktion eine Integration eines Inserts der gewünschten Länge aufgewiesen haben, wurde sequenziert.

2.2.1.12. Klonierung des 2c-scFv-Gensequenzen

Nach der Ermittlung der authentischen Sequenzen der V_H- und V_L-Gensequenzen aus der 2c-Hybridomzelllinie wurde mit Hilfe der beschriebenen PCR-Verfahren ein Antikörper-Fragment im scFv-Format generiert. Die Durchführung lag folgendem Schema zu Grunde:

Tab. 9: Generierung des 2c-scFv durch Fusion der V_H- und V_L-Gene mittels überlappender PCR

Schritt 1: Amplifikation der verlängerten V_H- und V_L-Abschnitte			
Amplifikation V _H :			
	Sense-Primer	Antisense-Primer	Zyklen
Teil 1: (innere PCR):	2cVH#1-up T _m = 78°C	2cVH#2-do T _m = 72°C	10
Teil 2: (äußere PCR):	2cVH#3-up T _m = 76°C	2cVH#4-do T _m = 94°C	15
Amplifikation V _L :			
Teil 1: (innere PCR):	2cVL#1-up T _m = 70°C	2cVL#2-do T _m = 74°C	10
Teil 2: (äußere PCR):	2cVL#3-up T _m = 94°C	2cVL#4-do T _m = 74°C	15
Schritt 2: Überlappende PCR der beiden Produkte aus Schritt 1			
	Sense-Primer	Antisense-Primer	Zyklen
	2cVH#3-up T _m = 76°C	2cVL#4-do T _m = 74°C	20

Durch Amplifikation der V_H/V_L-Gene mit geeigneten Primern wurden diese um die für die Klonierung in den Expressionsvektor pHOG21 (116) benötigten Restriktions-Schnittstellen NcoI am 5'-Ende des V_H-DNA-Fragmentes bzw. BamHI am 3'-Ende des V_L-DNA-Fragments verlängert. Gleichzeitig wurde jeweils am entgegengesetzten Ende ein Teilabschnitt der (Gly₄Ser)₃-Linkerpeptidsequenz, welche die V_H- und V_L-Domänen miteinander verbindet, angefügt. Beide PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe einer überlappenden PCR zu einem scFv vervollständigt (94, 123). Zu diesem Zweck wurden zunächst im ersten Schritt 0,5 µg V_H- bzw. V_L-DNA in 10 PCR-Zyklen unter Einsatz der

inneren Primer (Tab. 9) amplifiziert. Nach anschließender Zugabe der äußeren Primer (Tab. 9) erfolgte die Fortsetzung der PCR für weitere 15 Zyklen. Im Anschluss wurden die Produkte auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.1.5) und aus dem Gel aufgereinigt (2.2.1.7). Die auf diese Weise gewonnenen verlängerten V_H- bzw. V_L-Fragmente überlappten sich im Bereich der Linkersequenz über eine Länge von 18 Nukleotiden. Zur Generierung des scFv-Fragmentes wurden die Produkte aus Schritt 1 mittels einer überlappenden PCR miteinander kombiniert. Zur optimalen Aneinanderlagerung der V_H- und V_L-Fragmente wurden zunächst 5 PCR-Zyklen ohne Zugabe von Primern durchgeführt. Im Anschluss erfolgten die Zugabe der Oligonukleotide und die Durchführung weiterer 15 Zyklen. Das Produkt der überlappenden PCR wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und aufgereinigt. Nach einem NcoI- / BamHI-Restriktionsverdau (2.2.1.6) und anschließender Aufreinigung wurde das amplifizierte 2c-scFv-DNA-Fragment in den linearisierten pHOG21 Expressionsvektor ligiert (2.2.1.10) und sequenziert.

2.2.1.13. Transformation kompetenten Bakterien

Als Transformation bezeichnet man die nichtvirale Aufnahme freier DNA in kompetente Bakterienzellen (auch in Pilz-, Algen- oder Pflanzenzellen). Die Transformation wird zur Amplifikation einer in einen Plasmid-Vektor integrierten, rekombinanten DNA genutzt. Dabei können entweder chemisch kompetente Bakterien mittels Hitzeschockverfahren, oder elektrokompente Bakterien mittels Elektroporation transformiert werden.

2.2.1.14. Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation mittels Hitzeschockverfahren wurden chemisch kompetente TOP 10 One Shot™ Bakterien der Firma Invitrogen verwendet. Die tiefgefrorenen Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut. In einem vorgekühlten 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen wurden 1 – 5 µl (10 pg – 100 ng) Plasmid-DNA mit 25 µl Bakterien-Suspension vermennt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock (45 sec, 42°C) wurden die Bakterien erneut für 2 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde nun in 250 µl vorgewärmten SOC-Medium (Super Optimal Broth Medium, mit Zusatz von 20 mM Glucose) aufgenommen und für 1 h bei 37°C auf einem Schüttelinkubator bei 225 rpm inkubiert. Danach wurden jeweils 50 µl bzw. 200 µl dieser Suspension auf vorgewärmte, antibiotikahaltige (Ampicillin) LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.15. Transformation elektrokompetenter Bakterien

Für die Transformation von Plasmid-DNA mittels Elektroporation wurden elektrokompetente XL1-Blue oder TG1 Bakterien der Firma Stratagene verwendet. In einem vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 4 µl Bakterien mit 41 µl kaltem ddH₂O und 5 µl des Ligationsansatzes vorsichtig durchgemischt. Im Anschluss wurde die Suspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und in das *Gene Pulser* Elektroporationsgerät eingesetzt. Die Elektrotransformation erfolgte bei 25 µF, 200 Ω und 1,75 kV bei einem Elektrodenabstand von 0,1 cm. Unmittelbar nach dem Stromimpuls wurde der Elektroporationsansatz mit 950 µl SOC-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37°C auf einem Schüttelinkubator bei 225 rpm inkubiert. Danach wurden jeweils 50 µl bzw. 200 µl dieser Suspension auf vorgewärmte, antibiotikahaltige (Ampicillin) LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.16. Blau-Weiß-Screening

Die Selektion von Bakterienkolonien, deren Bakterien das gewünschte DNA-Plasmid enthalten, erfolgte mittels Blau-Weiß-Screening. Viele Klonierungsvektoren (pCR2.1-TOPO, pCR4-TOPO, pHOG21 u.a.) enthalten das β-Galactosidase-Gen. Die Expression dieses Enzyms führt zur Spaltung von X-Gal unter Bildung von 5-Brom-4-chlor-indoxyl. Dieses bildet nach Oxidation an der Luft und Dimerisierung den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo. In der aminoterminalen Sequenz der β-Galactosidase befindet sich ein DNA-Abschnitt, dessen Sequenz aus mehreren hintereinander liegenden Restriktionsschnittstellen besteht (Mehrfachklonierungsstelle). Durch die Integration von fremd-DNA wie z.B. von PCR-Fragmenten in die MCS wird die Gensequenz der β-Galactosidase unterbrochen. Das Enzym wird dadurch nicht mehr exprimiert. Die enzymatische Spaltung von X-Gal und die damit assoziierte Bildung des blauen Farbstoffes sind damit unterbunden. Bei einer erfolgreich durchgeführten Klonierung erscheinen somit diejenigen Kolonien, deren Bakterien den Vektor mit dem gewünschten Insert beinhalten, weiß. Kolonien, deren Bakterien einen leeren Vektor enthalten, erscheinen blau.

2.2.1.17. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde entweder zu analytischen Zwecken (Sequenzierung) oder im präparativen Maßstab isoliert. Die Präparation zu analytischen Zweck erfolgte durch Kultivierung der Bakterien in 5 ml antibiotikahaltigen LB-Medium bei 37°C und 225 rpm im

Bakterienschüttler über Nacht. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Zur Isolierung der Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurden 100 ml (Midi) bzw. 250 ml (Maxi) ml Bakterienkulturen mit dem QIAprep Spin Midi- oder Maxiprep Kit (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers aufgearbeitet.

2.2.1.18. Ethanolpräzipitation von DNA

Die Ethanolpräzipitation (176) einer DNA-Probe erfolgte nach Zugabe eines 1/10 Volumens einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH = 5,8) und 2,5 Volumenanteilen 100%-igem Ethanol. Das Gemisch wurde für 2 h bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die Mischung 15 min bei 13,000 x g zentrifugiert und das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen (10 min, 13,000 x g). Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.1.19. Sequenzierung doppelsträngiger DNA

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA oder von der Firma MWG-Biotech nach aktuellen Standards durchgeführt. Die DNA wurde nach den von diesen Labors geforderten und dort einzusehenden Vorgaben aufgearbeitet. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software Vector NTI.

2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1. Produktion des löslichen 2c-scFv-Antikörpers in *E.coli*

Die Produktion des löslichen scFv-Fragmentes erfolgte mit Hilfe des bakteriellen Expressionsvektors pHOG21 (116). Zur Optimierung der Versuchsbedingungen für die Produktion des scFv-Antikörpers wurde eine Expression im analytischen Maßstab durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden elektrokompetente *E.coli* Bakterien des Stammes TG1 nach Transformation mit dem pHOG21-Plasmid in 5 ml 2-YT_{GA} Medium bei 37°C und 250 rpm über Nacht auf einem Bakterienschüttler inkubiert. Im Anschluss wurden mehrere Aliquots von jeweils 5 ml 2-YT_{GA}-Medium mit 250µl der Über-Nacht-Kultur angeimpft und bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8-1 wurden die Bakterien abzentrifugiert (10min, 1500 x g, Raumtemperatur). Die Sedimente wurden in jeweils 5 ml 2-YT_{SA}-Medium resuspendiert. Zur Induktion der Proteinexpression wurde das Medium mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen (0,1 - 2 mM) versetzt. Die Kulturen wurden bei

21°C für 15-21 Stunden geschüttelt (250 rpm). Zur Analyse der Proteinexpression des 2c-scFv in das bakterielle Periplasma wurden die Bakterien sedimentiert (25 min, 5600 x g, 4°C), in 1/20 Volumen (250 µl) eiskalten PP-Puffer (Extraktionspuffer) resuspendiert und für die Dauer von 1 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Suspensionen bei 3.000 x g eine Stunde lang zentrifugiert (4°C) und der 2c-scFv-haltige Überstand entnommen. Die qualitative Analyse der 2c-scFv-Antikörperproduktion erfolgte mittels Western-Blot-Analyse (2.2.2.7) mit dem c-myc spezifischen Antikörper 9E10. Nach Optimierung der Versuchsbedingungen wurde der scFv-Antikörper in großem Maßstab produziert. Die Produktion erfolgte unter den beschriebenen Bedingungen in einem Gesamtvolumen von 4 l. Die Induktion erfolgte mit der zuvor optimierten Konzentration von 1mM IPTG. Die Aufreinigung des scFv-Antikörpers erfolgte mittels immobilisierter Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (Ni-NTA-IMAC) (2.2.2.2)(95, 206).

2.2.2.2. Aufreinigung des 2c-scFv-Antikörpers mittels Ni-NTA-IMAC und FPLC

Die Aufreinigung des entweder in *E.coli* oder in der eukaryotischen Zelllinie NSO produzierten Antikörpers erfolgte mittels immobilisierter Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (NI-NTA-IMAC). Zu diesem Zweck wurden die Periplasma-Präparation (2.2.2.1) bzw. der 2c-scFv-haltige Zellkulturüberstand gegen den SP-10 Puffer dialysiert. Dazu wurde eine *Spectra/Por®*-Dialysemembran (6-8000 MWCO, Roth) verwendet. Im Anschluss wurde eine Biorad-Säule mit 750 µl resuspendierte Ni-NTA-Agarose, Kapazität 5 mg/ml, beladen. Die Säule wurde mit dem zwanzigfachen Säulevolumen (15 ml) SP-10 Puffer äquilibriert. Nach dem Beladen der Säule mit der dialysierten 2c-scFv-Präparation wurde die Säule mit dem 20-fachen Volumen SP-50 Puffer gewaschen. Die Elution des an die Ni-NTA-Agarose gebundenen scFv-Antikörpers erfolgte mit SP-Puffer mit aufsteigenden Imidazol-Konzentrationen (SP-100 bis SP-500). Es wurden 500 µl Fraktionen gesammelt, die anschließend mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung oder mittels Western-Blot-Analyse untersucht wurden. Die Fraktionen mit dem höchsten spezifischen Proteingehalt wurden zur weiteren Aufreinigung mittels FPLC gegen PBS dialysiert. Die Proben wurden entweder nach ihrem Molekulargewicht oder nach ihrer Ladung aufgetrennt. Um die Proteine ihrem Molekulargewicht nach aufzureinigen wurden die Proben auf eine Superdex 75 HL26/60 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) aufgetragen und der Größe nach aufgetrennt. Dadurch konnten scFv-Fragmente von Dimeren, Aggregaten und anderen Verunreinigungen befreit werden. Alternativ konnten 2c-scFv-Fragmente auf Grund ihrer Ladung über die Kationen-Austauschsäule MonoS GL5/50

(GE Healthcare) nach Bestimmung des isoelektrischen Punktes des scFv-Antikörpers (0) separiert werden. Die Proben wurden zunächst gegen den MonoS Start-Puffer dialysiert. Nach Äquilibration der MonoS-Säule mit dem MonoS Start-Puffer und dem Auftragen der 2c-scFv-haltigen Probe wurden die Proteine durch sukzessive Erhöhung der Salzkonzentration eluiert. Die Auftrennung der Proben wurde photometrisch (OD_{280}) verfolgt. Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt wurden gegen PBS dialysiert und mit Hilfe einer Amicon® Ultra-15 Zentrifugaleinheit (MWCO = 10.000 Da, Millipore) einkonzentriert.

2.2.2.3. Aufreinigung monoklonaler IgG-Antikörper

Monoklonale IgG-Antikörper mit humanen bzw. murinen Fc-Teil wurden affinitätschromatographisch mit Hilfe einer Protein-A Säule aufgereinigt. Die Kapazität der Protein-A Agarose beträgt 12-19 mg/ml für humane bzw. 6-8 mg für murine Antikörper. Zunächst wurde der Zellkulturüberstand auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt. Protein-A weist optimales Bindungsverhalten gegenüber murinen Fc-Fragmenten bei pH = 7,4 auf. Im Falle von humanen Fc-Fragmenten liegt das Optimum bei pH = 8. Die Protein-A Säule wurde mit dem 10-20-fachen Volumen Protein-A Bindepuffer äquilibriert. Das Auftragen der Probe erfolgte anschließend mit Hilfe einer speziell zu diesem Zweck hergestellten Apparatur über Nacht. Nach einem Waschschrift mit dem 30-fachen Säulenvolumen Bindepuffer wurden die an das Protein-A gebundenen Antikörper mit 10 ml Protein-A Elutionspuffer von der Säule gelöst. Es wurden jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt. Zur Neutralisation des pH-Wertes wurden in die Sammelgefäße 200 µl Protein-A Neutralisationspuffer vorgelegt. Der Antikörpergehalt und die Reinheit der Fraktionen wurde mittels SDS-Gelelektrophorese (2.2.2.6) oder mittels analytischer FPLC unter Verwendung der Superdex 200 HL 16/60 Säule untersucht.

2.2.2.4. Generierung von 2c-F(ab')₂-Fragmenten durch Pepsin-Verdau

Durch proteolytische Pepsin-Spaltung des monoklonalen Antikörpers 2c wurden 2c-F(ab')₂-Fragmente generiert. Hierfür wurde das ImmunoPure®-F(ab')₂-Preparation-Kit verwendet. Alle Schritte wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die zuvor erforderliche Einkonzentrierung des monoklonalen Antikörpers auf eine Endkonzentration von 10 mg/ml erfolgte mit Hilfe einer Amicon® Ultra-15 Zentrifugaleinheit (MWCO = 30.000 Da, Millipore). Im Anschluss an den Verdau erfolgte eine Aufreinigung über eine Protein-A Säule. Dadurch konnten die Fc-Fragmente von den F(ab')₂-Fragmenten separiert

werden. Die durch Pepsin-Verdau als unerwünschtes Nebenprodukt entstandenen Fab-Fragmente konnten durch präparative FPLC mit Hilfe einer Superdex 200 HL 16/60 Säule von den F(ab')₂-Fragmenten getrennt werden.

2.2.2.5. Generierung von 2c-Fab-Fragmenten durch Papain-Verdau

Monovalente 2c-Fab-Fragmente wurden durch Papain-induzierte, enzymatische Spaltung des mAk 2c hergestellt. Dazu wurde das ImmunoPure[®]-Fab-Preparation-Kit verwendet. Die Prozedur wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die 2c-Fab-Fragmente wurden von unverdauten IgG-Antikörpern und Fc-Fragmenten affinitätschromatographisch über eine Protein-A Säule homogen aufgereinigt. Die Reinheit des Produktes wurde mittels SDS-Gelelektrophorese (2.2.2.6) und durch analytische FPLC mit Hilfe einer mit Größenstandards kalibrierten Superdex 200 HL 16/60 untersucht.

2.2.2.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Untersuchung proteinhaltiger Proben erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE (130). Dazu wurden die proteinhaltigen Proben im Verhältnis 1 : 2 mit dem denaturierenden und reduzierendem 2 x SDS-Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte anschließend auf einem 4-20%-igem Tris-Glycin Gel (Invitrogen) in einer SDS-Gel-Kammer für 90 Minuten bei 125 V. Zur Auswertung wurden die Proteine entweder durch Anfärbung mit dem Coomassie-Farbstoff (66) sichtbar gemacht oder mittels Western-Blot-Analyse (2.2.2.7) durch Immunfärbung mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert.

2.2.2.7. Western-Blot-Analyse

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Immunfärbung dieser Proteine nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran mit Hilfe spezifischer, POD-konjugierter Antikörper (201). Zum Transfer der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran das SDS-Gel auf eine mit Semi-Dry Puffer befeuchtete Nitrozellulose-Membran überführt und luftblasenfrei zwischen zwei Lagen ebenfalls befeuchteten Filterpapier (Whatmanpapier) gelegt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte über eine Dauer von 25 Minuten bei 20V (1,5 mA/cm²). Die Detektion der an die Nitrozellulose-Membran gebundenen Proteine erfolgte durch HRP-konjugierte Antikörper. Zu diesem Zweck wurde die Membran zunächst mit Blockpuffer

abgesättigt. Im Falle einer indirekten Färbung erfolgte zunächst Inkubation mit einem spezifischen, unkonjugierten Primärantikörper (in 2x-TNT-Puffer verdünnt). Die Membran wurde dreimal mit 1 x TNT-Puffer für 10-20 min gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit Detektionsantikörpern bzw. mit einem Erstantikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur (alternativ bei 4°C über Nacht). Die Membran wurde wie zuvor beschrieben gewaschen. Zur Entfernung des Detergenz wurde ein weiterer, kurzer Waschschrift (5 min) mit TBS-Puffer durchgeführt. Die Auswertung erfolgte nach Inkubation der Nitrocellulose-Membran mit dem Substrat (ECL-Reagenz) entweder auf einem Fotopapier oder mit Hilfe einer lichtsensitiven Kamera des LAS-3000 Imaging Systems (Fujifilm).

2.2.2.8. Charakterisierung des mAk 2c Epitops mittels SDS-PAGE

Die Charakterisierung des durch den mAk 2c erkannten HSV-gB-Epitopes erfolgte durch eine modifizierte SDS-PAGE (15). Das rekombinante HSV-1 GB-Protein wurde entweder unter denaturierenden Bedingungen, oder unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen auf einem 8%-igem SDS-Gel (2.2.2.6) analysiert. Der signifikante Unterschied bestand in der Vorbehandlung der GB-Proben. Die Proben (0,75 µg) wurden 1 : 1 mit 2-fach konzentriertem SDS-Puffer mit bzw. ohne Zusatz der reduzierenden Reagenz β-Mercaptoethanol vermischt. Letztere wurden zusätzlich für 5 min bei 95°C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 125 V für die Dauer von 90 min. Die Bindungseigenschaften des mAk 2c gegenüber dem Glykoprotein B wurden mit den bereits publizierten Daten der kommerziell erhältlichen Antikörpern H126 (154) und H1817 (15) verglichen.

Tab. 10: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele. Es wurden ein 8%-iges Trenngel und ein 5%-iges Sammelgel verwendet. APS und TEMED wurden als letztes zugegeben um eine vorzeitige Polymerisation zu verhindern.

	30 % Acrylamid/ Bis-acrylamid	1,5 M Tris-HCl pH 8.8	1 M Tris-HCl pH 6.8	10 % SDS	10 % APS	TEMED	ddH ₂ O	Gesamt- Volumen
5 % Sammelgel	1,5 ml	---	1,25 ml	100 µl	40 µl	10 µl	7,1 ml	10 ml
8 % Trenngel	5,3 ml	5 ml	---	200 µl	200 µl	20 µl	9,3 ml	20 ml

2.2.2.9. Isoelektrische Fokussierung

Der isoelektrische Punkt des 2c-scFv-Antikörpers wurde durch isoelektrische Fokussierung ermittelt. Die Durchführung erfolgte in der *Xcell SureLock* Minicell SDS-Gel-Kammer (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers. Zu Elektrolyse wurden der IEF-Anoden- und der IEF-Kathoden-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit dem IEF-Probenpuffer vorbehandelt. Als Größenstandard diente der IEF-Marker (Detektionsbereich IP = 3-10). Die Elektrophorese wurde in drei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt (1 h bei 100 V, 1 h bei 200 V, 30 min bei 300 V). Unmittelbar nach der Elektrophorese wurde das Gel mit einer 12%-igen (v/v) TCA-Lösung (Trichloressigsäure) fixiert um eine Präzipitation des Coomassie-Farbstoffes bei der anschließenden Färbung zu verhindern. Um die Sensitivität der Detektionsmethode zu erhöhen wurde der 2c-scFv-Antikörper nach Coomassie-Färbung auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und spezifisch mit dem Maus-anti-c-myc-Antikörper 9E10 mittels Western-Blot-Analyse (2.2.2.7) detektiert. In einem weiteren Ansatz wurde der Trennbereich des Gels, in dem der scFv-Antikörper zuvor dem IP nach aufgetrennt wurde, ausgeschnitten und in ein dafür vorgesehenes SDS-Gel (Invitrogen) eingesetzt. Nach einer weiteren Elektrophorese wurden die Fragmente zwecks eindeutiger Zuordnung mit Größenstandards in Relation gesetzt.

2.2.2.10. Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Antikörper-Konzentration erfolgte photometrisch bei 280 nm unter Berücksichtigung folgender Umrechnungskoeffizienten:

Tab. 11: Umrechnungskoeffizienten zur Bestimmung der Antikörperkonzentration. Der Umrechnungsfaktor zwischen Absorption und Protein-Konzentration wurde der Literatur (43) entnommen, oder im Fall des 2c-scFv-Fragmentes mit der VNTI-Software an Hand der Proteinsequenz errechnet.

Protein	Absorption A_{280}	Protein-Konzentration
IgG-Molekül	$A_{280} = 1$	0,699 mg/ml
F(ab') ₂ -Fragment	$A_{280} = 1$	0,676 mg/ml
Fab-Fragment	$A_{280} = 1$	0,654 mg/ml
2c-scFv-Fragment	$A_{280} = 1$	0,5 mg/ml

2.2.3. Immunologische Methoden

2.2.3.1. ELISA-Testverfahren (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Die Fähigkeit des monoklonalen Antikörpers 2c, dessen Derivate 2c-F(ab')₂ und 2c-Fab, des gentechnisch hergestellten 2c-scFv-Fragmentes zur spezifischen Antigenbindung erfolgte mit Hilfe des ELISA-Testverfahrens unter Verwendung des kommerziellen Enzygnost anti-HSV-IgG-Kits (DADE-Behring) mit geringfügigen Modifikationen. Zunächst wurden die antikörperhaltigen Proben auf spezielle, mit dem Zellkulturüberstand HSV-infizierter bzw. nichtinfizierter Zellkulturen beschichtete 96-Lochplatten aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C und zweimaligem Waschen mit 200 µl Waschpuffer wurden die gebundenen Antikörper mit spezifischen Sekundäantikörpern detektiert. Zur Detektion des mAk 2c wurde ein Ziege-anti-Maus-Fcγ-spezifischer, HRP-konjugierter polyklonaler Antikörper eingesetzt. Die Antigenbindung der Antikörperfragmente 2c-F(ab')₂ und 2c-Fab wurde mit Hilfe eines Ziege-anti-Maus-Fab-spezifischen bzw. gegen leichte Kette Kappa (κ) gerichteten und HRP-konjugierten Antikörpers nachgewiesen. Zum Nachweis des spezifisch gebundenen 2c-scFv-Fragmentes wurden der c-myc spezifische Antikörper 9E10 als Sekundäantikörper und ein Ziege-anti-Maus-Fcγ-spezifischer, HRP-konjugierter Antikörper als Tertiäantikörper verwendet. Bis auf die genannten Modifikationen erfolgte die Test-Durchführung nach dem Handbuch des Herstellers. Die Quantifizierung der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem GENios Plus ELISA-System bei einer Wellenlänge von 450 nM.

2.2.3.2. Selektion von mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4 Transfektanden

Die Selektion transfizierter Antikörper-produzierender (mAk ch2c, mAk hu2c V1-V4) SP2/0-Einzelklone erfolgte mit Hilfe des ELISA-Testverfahrens unter Verwendung des kommerziellen Enzygnost anti-HSV-IgG-Kits (DADE-Behring) nach Herstellerangaben. Die Zellkulturüberstände der Antikörper-produzierenden Zellen wurden auf die mit HSV-Antigenen beschichteten Platten in einem Volumen von 100 µl überführt. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte analog den Herstellerangaben. Einzelklone mit quantitativer Antikörperproduktion wurden für die weitere Kultivierung und anschließende serumfreie Antikörperproduktion ausgewählt.

2.2.3.3. Antikörpervermittelte Inhibition des „cell-to-cell spreads“

Eine Besonderheit der Herpesviren ist deren Fähigkeit sich auf direktem Weg von einer infizierten Zelle zu einer benachbarten nicht-infizierten Zelle auszubreiten („cell-to-cell spread“). Die antikörpervermittelte Inhibition des „cell-to-cell spreads“ wurde im Rahmen dieser Arbeit nach immunhistochemischer Färbung von HSV-infizierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst jeweils 2×10^5 Vero-Zellen in 1 ml Kulturmedium (DMEM, 2% FCS, U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte, in der sich jeweils ein mit Ethanol vorbehandeltes 12 mm Deckglas befand, kultiviert. Am Folgetag wurde das Kulturmedium verworfen und die Zellen mit einer Viruslast von 200 TCID₅₀ HSV-1 F in einem Volumen von 500 µl Kulturmedium pro Vertiefung infiziert. Vier Stunden nach Infektion wurde der virushaltige Überstand verworfen, ungebundene Viruspartikel durch zweimaliges Waschen mit 500 µl PBS entfernt, und die Zellen mit 500 µl Kulturmedium versetzt. Zur Neutralisation der in den Zellüberstand freigesetzten Herpesviren wurden dem Medium neutralisierende Antikörper in Überschusskonzentrationen hinzugefügt. Die Antikörper mAk 2c, ch2c, hu2c V1-V4 und das 2c-F(ab')₂-Fragment wurden in den Konzentrationen 1000 nM und 500 nM eingesetzt. Das monovalente 2c-Fab-Fragment wurde in mit 3000 nM bzw. 1500 nM appliziert. Als Kontrolle wurde humanes, HSV-neutralisierendes Serum (Diagnostische Abteilung der Virologie, Universitätsklinikum Essen) mit einer Verdünnung von 1:20 in Kulturmedium eingesetzt. Der Neutralisationstiter des Serums betrug 1:160. Nach einer Inkubationsdauer von zwei Tagen wurde das Inokulationsmedium verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit HEPES/Saline-Puffer wurden die Zellen durch Überschichtung mit jeweils 500 µl/Vertiefung einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach weiteren 15 min wurde der Überstand verworfen und die Zellen dreimal mit HEPES/Saline-Puffer gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch 15-minütige Inkubation mit HEPES/Saline-Puffer + 0,05% Tween20 geblockt. Anschließend wurden HSV-infizierte Zellen mit Hilfe eines polyklonalen, FITC-konjugierten Ziege-anti-HSV-Antikörpers angefärbt. Nach 45 Minuten wurde der Überstand verworfen. Die Deckgläser wurden nach erneutem Waschen der mit Hilfe von Mowiol (Calbiochem) mit der zellbeschichteten Seite auf Glasobjektträger fixiert. Um eine Austrocknung zu verhindern wurden die Deckgläser zusätzlich mit Klarlack abgedichtet. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des konfokalen Leica DM IRE2 Mikroskops bei einer 40-fachen Vergrößerung.

2.2.3.4. Durchflusszytometrie „fluorescence activated cell sorting“ (FACS)

Die spezifische Bindung des mAk 2c, dessen Derivate und der rekombinant hergestellten Antikörper an das im Zuge des HSV-Replikationszyklus auf der Oberfläche infizierter Zellen präsentierte gB-Antigen wurde durchflusszytometrisch untersucht.

2.2.3.5. Durchflusszytometrische Bestimmung der funktionellen Affinität

Die funktionelle Affinität eines Antikörpers ist ein Maß für die Stärke der Wechselwirkung zwischen einem Antikörper und einem Antigen. Im Falle von monovalenten Antikörperfragmenten (scFv, Fab) entspricht diese der tatsächlichen Affinität, d.h. der Interaktion zwischen einer Antigenbindungsstelle (Paratop) auf dem Antikörper und einem korrespondierenden Epitop auf dem Antigen. Bindet ein bivalenter Antikörper an ein intaktes polyvalentes Antigen (Viren, Bakterien), so bezeichnet man die Bindungskraft auch als Avidität. Die funktionelle Affinität wird durch die Gleichgewichtskonstante K_D beschrieben (9). Diese wurde durchflusszytometrisch durch Charakterisierung der Bindungseigenschaften zwischen Antikörpern/Antikörperfragmenten und infizierten Vero-Zellen, die im Zuge des natürlichen HSV-Replikationszyklusses das gB-Antigen als membranassoziiertes Glykoprotein auf der Zelloberfläche exprimieren, bestimmt. Vero-Zellen (ca. 80 % konfluent) wurden mit einer Viruslast von 3 MOI HSV-1 F infiziert. Nach einer Inkubationszeit von 16-20 Stunden wurden das virushaltige Inokulationsmedium verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsin/EDTA in Suspension gebracht. Die Zellen wurden 5 min bei 300 x g pelletiert und im FACS-Puffer entsprechend einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Die Suspension wurde in einem Volumen von 100 µl/Loch gleichmäßig auf eine 96-Loch-Platte verteilt. Zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_D wurden die pelletierten Zellen in Triplets mit einer 1:2 Verdünnungsreihe (0,03 – 500 nM) der neutralisierenden Antikörper bzw. Antikörperfragmente für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 200 µl FACS-Puffer wurden die spezifisch an das gB-Antigen gebundenen Antikörper durch FITC-konjugierte Detektionsantikörper analysiert. Zur Detektion des mAk 2c wurde ein Ziege-anti-Maus-Fcγ-spezifischer und FITC-konjugierter, monoklonaler Antikörper eingesetzt. Die Antigenbindung durch die Antikörperfragmente 2c-F(ab')₂ und 2c-Fab wurde mit Hilfe eines Ziege-anti-Maus-Fab-spezifischen, FITC-konjugierten Antikörpers nachgewiesen. Um gebundene scFv-Fragmente nachzuweisen, wurde zunächst der c-myc spezifische Primärantikörper 9E10 eingesetzt. Nach zwei Waschschritten wurde dieser durch einen Ziege-anti-Maus-Fcγ-spezifischen, FITC-konjugierten Antikörper

detektiert (17, 156). Nach einer Inkubationszeit von 15 min wurden ungebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen entfernt, und die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Im Anschluss wurde für jede Probe die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) durchflusszytometrisch ermittelt. Zur Kontrolle wurden infizierte Zellen nur durch Inkubation mit Sekundärantikörpern inkubiert und die MFI bestimmt. Zur Eliminierung der Hintergrundfluoreszenz wurden diese Werte von den zuvor ermittelten Mai-Werten der Proben subtrahiert. Die Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K_D erfolgte unter Anwendung der Marquardt und Levenberg Methode für nichtlineare Regression mit der Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software) (5).

2.2.3.6. Untersuchung der biophysikalischen Stabilität

Zur Bestimmung der biophysikalischen Stabilität der Antikörper wurden die aufgereinigten Antikörper mAk 2c, ch2c und der humanisierte Antikörper hu2c V1 bei einer Konzentration von 100 nM in einem Volumen von 50 µl über einen Zeitraum von 30 Tagen bei 37°C in PBS inkubiert. Zu Stabilisierungszwecken wurde BSA mit einer Endkonzentration von 10 mg/ml eingesetzt. Nach Entnahme der Proben in bestimmten Zeitintervallen (0h, 0,5h, 1h, 2h, 4h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 172h, 2 Wochen und 4 Wochen) nach Versuchsbeginn wurden diese bei -20°C aufbewahrt. Die Bindungseigenschaften der Antikörper wurden im Anschluss an den Versuch an HSV-1 F infizierten Vero-Zellen wie zuvor beschrieben (2.2.3.5) analysiert.

2.2.3.7. Kompetitionsstudien zur Analyse der Epitopspezifität von Antikörpern

Die Spezifität des rekombinant hergestellten chimären Antikörpers ch2c und der humanisierten Varianten hu2c V1-V4 wurde mit Hilfe von Kompetitionsstudien untersucht (6, 123). Dabei wurde überprüft, ob diese Antikörper mit dem parentalen murinen Antikörper 2c um dieselbe Antikörperbindungsstelle in Konkurrenz treten. Zu diesem Zweck wurden mit 3 MOI HSV-1 F infizierte Vero-Zellen einen Tag nach Infektion mit abgestuften Konzentrationen (1000 nM – 0,98 nM) des chimären mAk bzw. den humanisierten hu2c Varianten V1-V4 als Kompetitor für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 200 µl FACS-Puffer wurde in einem zweiten Inkubationsschritt der parentale mAk 2c mit einer konstanten Konzentration von 100 nM eingesetzt und seine Bindung mittels des fluoreszenzmarkierten, gegen die murinen konstanten Domänen gerichteten Ziege-anti-Maus-Antikörper durchflusszytometrisch nachgewiesen. Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden in einem parallelen Ansatz die

beiden Färbungsschritte in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Die spezifische Bindung der in diesem Ansatz mit konstanter Konzentration (100 nM) eingesetzten Antikörper mit humaner Fc-Domäne (mAk ch2c, mAk hu2c V1-V4) wurde mit einem Kaninchen-anti-Mensch- Fc γ -spezifischen, FITC-konjugierten Antikörper detektiert.

2.2.4. Zellkulturmethoden

2.2.4.1. Kultivierung von Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C in einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre und einer 90 %-igen Luftfeuchtigkeit kultiviert. Je nach Wachstum und Zelldichte wurde die Passagierung ein- bis zweimal pro Woche durchgeführt. Um eine Mycoplasma-freie Kultivierung der Zelllinien sicherzustellen wurde in regelmäßigen Abständen ein PCR-basierender (AppliChem) Routinescreen auf Mycoplasma-DNA durchgeführt.

2.2.4.2. Kultivierung von Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), das zusätzlich mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% FCS versetzt war, kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 90%-100% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgegossen und der Zellverband mit 10 ml PBS (Ca²⁺ und Mg²⁺-frei) gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Zelldissoziationslösung Trypsin/EDTA wurde der Zellverband proteolytisch in Einzelzellsuspensionen aufgelöst. Diese wurden in 10 ml Medium resuspendiert und in einer 1:10 Verdünnung weiterkultiviert.

2.2.4.3. Kultivierung der 2c-Hybridomzellen

Die Kultivierung der 2c-Hybridomzellen erfolgte in *Iscove's Modified Dulbecco's Medium* (IMDM), versetzt mit 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 10% FCS. Die semi-adhären wachsenden Zellen wurden mit Hilfe einer Pipette resuspendiert und in einer 1:10 Verdünnung weiterkultiviert.

2.2.4.4. Kultivierung von NS0-Zellen

NS0-Zellen wurden routinemäßig in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin). Die Passagierung erfolgte in einem zeitlichen Intervall von 3-4 Tagen, dabei wiesen die Zellen eine 80%-ige Konfluenz

auf. Zur Weiterkultivierung wurden die resuspendierten Zellen in einem Verhältnis von 1 : 10 in Kulturmedium verdünnt.

2.2.4.5. Kultivierung Antikörper-produzierender SP2/0-Myelomzellen

Die Zellkultivierung der SP2/0 Zelllinie erfolgte im *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 50 µm β-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin). Die Passagierung erfolgte analog der für NSO-Zellen beschriebenen Vorgehensweise.

2.2.4.6. Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität

Die Zellzahl und die Vitalität wurden mit Hilfe einer Neubauer-Kammer ermittelt. Zur Differenzierung zwischen toten und vitalen Zellen wurde Trypanblau eingesetzt. Dazu wurden 100 µl resuspendierte Zellen mit gleichem Volumen Trypanblau vermischt. Tote Zellen können den Farbstoff aufnehmen und zeichnen sich unter dem Lichtmikroskop durch ihre blaue Färbung aus.

2.2.4.7. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Langzeitlagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Dazu wurden 5×10^6 – 1×10^7 vitale Zellen in Einfriermedium (90% FCS, 10% Kryoprotektant DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden zunächst in einem mit Isopropanol gefülltem Einfrierbehälter (Kühlungsrate von 1°C/min) auf -80°C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Rekultivierung wurden die Zellen rasch bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit dem 10-fachen Volumen Kultivierungsmedium vermischt. Durch Zentrifugation (5 min, 200 x g) wurden die Zellen pelletiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde verworfen und die Zellen in Medium in Kultur genommen.

2.2.4.8. Transfektion von NS0-Zellen

Die ursprüngliche eukaryotische NS0-Zelllinie produziert keine Antikörper und weist eine geringe endogene Glutamin-Synthetase Aktivität auf. Um eine 2c-scFv-Produktion zu induzieren, wurden die Zellen mit dem pEE12-Vektor transfiziert. Zu diesem Zweck wurde eine Suspension von 1×10^7 NS0-Zellen (in PBS) mit 40 µg Plasmid-DNA (in H₂O, Endotoxin-frei) in einer GenePulser-Küvette in Gesamtvolumen von 800 µl für die Dauer

von 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zwei konsekutiven Pulsen (1500 V, 3 μ F, 200 Ω) und einer erneuten 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 30 ml Kulturmedium (DMEM, 10 % FCS, Antibiotika, 2 mM L-Glutamin) resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 20 ml auf vier 96-Loch-Platten verteilt (50 μ l/Loch = $1,7 \times 10^4$ Zellen/Loch). Die verbliebenen 10 ml Zellsuspension wurden durch Zugabe weiterer 30 ml Kulturmedium verdünnt. Davon wurden 30 ml auf fünf 96-Loch-Platten ausplattiert (50 μ l/Loch = $4,1 \times 10^3$ Zellen/Loch). Die übrigen 10 ml wurden nach Zugabe von 40 ml Kulturmedium auf weitere fünf 96-Loch-Platten verteilt (50 μ l/Loch = $8,25 \times 10^2$ Zellen/Loch). Im Anschluss wurden die Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert (37°C, 5 % CO₂). Das Plasmid pEE12 beinhaltet neben dem 2c-scFv-Gen auch eine für das Enzym Glutamin-Synthetase kodierende Sequenz. Mit Hilfe dieses Enzyms sind die transfizierten Zellen zur Synthese von Glutamin in der Lage und können somit im Glutamin-freien Medium überleben. Zur Selektion von stabil transfizierten Zellen wurden die Zellen in Glutamin-freien Selektionsmedium (DMEM, 10 % FCS, GS-Supplement (1x), Antibiotika) umgesetzt und weiterkultiviert. Die Einzelklone wurden hinsichtlich der Sezernierung des 2c-scFv-Antikörpers in den Zellkulturüberstand im Dot-Blot-Verfahren überprüft. Zu diesem Zweck wurden 50 μ l des Zellkulturüberstandes mit Hilfe der Dot-Blot-Apparatur auf Nitrozellulose-Trägermaterial punktförmig aufgetragen. Freie Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran wurden durch Inkubation mit 1%-Milchpulver/TNT blockiert. Die Detektion des scFv-Antikörpers über den c-myc-tag erfolgte auf dieselbe Weise wie im Western-Blot-Verfahren (2.2.2.7).

2.2.4.9. Eukaryotische Produktion des löslichen 2c-scFv-Antikörpers in NS0-Zellen

Nach der Auswahl des Klons mit der höchsten 2c-scFv-Produktionsrate wurde dieser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml expandiert. Die Zellen wurden in Kultur gehalten bis der prozentuale Anteil der lebenden Zellen unter 20 % gesunken ist. Die verbliebenen Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 min, 4000 x g) pelletiert. Anschließend wurde der 2c-scFv-haltige Überstand über eine IMAC-Säule aufgereinigt (2.2.2.2).

2.2.4.10. Produktion des murinen monoklonalen Antikörpers mAk 2c

Der murine monoklonale Antikörper mAk 2c wurde aus dem Überstand der 2c-Hybridomzelllinie gewonnen. Das Gesamtvolumen eines Produktionsansatzes betrug 1l. Zunächst wurden 2c-Hybridomzellen in zehn 75 cm²-Zellkulturflaschen verteilt und in Kulturmedium bis auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml (1×10^7 Zellen/Flasche) kultiviert. Die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindenden Zellen wurden jeweils für 5 min

bei 200 x g pelletiert, mit PBS gewaschen, erneut pelletiert, in 50 ml serumfreien Produktionsmedium (EX-Cell™ 620-HSF serumfreies Medium (SAFC Biosciences), 10 mM L-Glutamin) resuspendiert und in eine 175 cm²-Flasche überführt. Zum Zeitpunkt des Erreichens einer 80 – 90%-igen Konfluenz wurden die Zellen 1:2 in Produktionsmedium verdünnt und die Zellsuspensionen auf insgesamt 20 x 175 cm²-Flaschen verteilt. Die Vitalität wurde mittels Trypanblau-Färbung regelmäßig kontrolliert. Die Kultivierung der Zellen wurde bis zur Herabsenkung der Vitalität unter die 20%-Marke fortgeführt.

2.2.4.11. Produktion der rekombinanten Antikörper ch2c und hu2c V1-V4

Die Produktion der rekombinanten Antikörper mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4 erfolgte nach derselben Vorgehensweise wie im Fall des parentalen Antikörpers 2c. Im Unterschied dazu wurde für die serumfreie Antikörperproduktion das EX-Cell™ SP 2/0 Medium mit Zusatz von 10 mM L-Glutamin verwendet.

2.2.4.12. Herstellung eines Herpes-Simplex-Virus-Stocks

Die Herstellung eines HSV-Stocks erfolgte durch Infektion von Vero-Zellen mit infektiösem Material. Zu diesem Zweck wurden Vero-Zellen bis zum Erreichen einer Konfluenz von 100% im Kulturmedium inkubiert. Im Anschluss wurde das Kulturmedium entfernt und nach einmaligem Waschen mit PBS durch frisches Medium einer reduzierten FCS-Konzentration ersetzt (DMEM, 2% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin). Die Infektion erfolgte durch Applikation von 100 µl einer virushaltigen Probe (Patientenmaterial oder eine Viruspräparation). Nach der Ausbildung eines maximalen cytopathischen Effekts (CPE) wurden zur Maximierung des Virustiters noch nicht lysierten Zellen durch drei Einfrier-Auftau-Zyklen (-80°C, Raumtemperatur) zerlegt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (15 min, 3700 x g) pelletiert. Der virushaltige Überstand wurde nach erneuter Zentrifugation entnommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.4.13. Bestimmung des HSV-Titers mittels Endpunkttitration

Der Virustiter von HSV-Stocks wurde durch Bestimmung der TCID₅₀ („tissue culture infectious dose“, 50%) mittels Endpunkttitrationsverfahrens nach der Methode von Spearman und Kärber (110, 190) ermittelt. Zu diesem Zweck wurden 2 x 10⁴ Vero-Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte ausplattiert. Am Folgetag wurde mit der zu untersuchenden Virusprobe eine log-10-Verdünnungsreihe erstellt (10⁻¹ – 10⁻⁸). Nach einer Inkubationsdauer von 6 Tagen

wurden die Lochplatten unter dem Lichtmikroskop auf positiven cytopathischen Effekt untersucht. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe folgender Formel:

$$T = 10^{1+d \cdot (S-0,5)}$$

T = Virustiter (TCID₅₀ / eingesetztes Volumen, in diesem Fall 100 µl)

d = Verdünnungsfaktor (log 10 der Verdünnung), bei einer 10-fach Verdünnung =1

S = Summe der Quotienten aus den jeweiligen Verdünnungen

(Vertiefungen einer Verdünnung mit einem positiven CPE/10)

Die Umrechnung zwischen TCID₅₀/ml und PFU/ml entspricht dem Faktor 0,7 log. Ein Titer von $T = 10^{6,3}$ TCID₅₀/ml gleicht somit einem Titer von $10^{5,6}$ PFU/ml.

2.2.4.14. HSV-Neutralisationstest

Zur Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit der hergestellten anti-HSV-Antikörper und Antikörperfragmente wurden unterschiedliche Antikörperverdünnungen (IgG-Antikörper und 2c-F(ab')₂-Fragmente 125 nM – 0,98 nM; 2c-Fab-Fragmente 3000 nM – 23 nM) mit einer jeweils konstanten Viruslast (100 TCID₅₀ HSV-1 oder HSV-2) für 1 h bei 37°C zur Reaktion gebracht. Die Antikörper-Virus-Gemische wurden auf Vero-Zellen einer Konfluenz von 80 – 90 % in 96-Loch-Mikrotiterplatten in einem Volumen von 100 µl pro Loch aufgetragen. Als Kontrolle wurden Vero-Zellen mit einer Virusdosis von 100 TCID₅₀ des eingesetzten Serotyps ohne vorhergehende Inkubation mit neutralisierenden Antikörpern infiziert. Die Ausprägung des cytopathischen Effektes wurde drei Tage nach Infektion lichtmikroskopisch untersucht. Als Neutralisationstiter wurde die höchste Antikörperverdünnung festgelegt, bei der das Virus vollständig durch spezifische Antikörper neutralisiert und die Ausbildung eines CPE in den inokulierten Zellkulturen verhindert wurde. Darüber hinaus konnte der Neutralisationstiter, bei dem 50 % der Zellkulturen vor der Infektion geschützt waren, wie folgt berechnet werden:

$$T = x + \left(\frac{b}{10} \cdot x\right)$$

T = Neutralisationstiter, bei dem 50 % der infizierten Zellkulturen vor Infektion geschützt sind.

x = Niedrigste Antikörperverdünnung, bei der mindestens 50 % der Zellkulturen infiziert sind

b = Anzahl der infizierten Zellkulturen, die bei der Verdünnung x die 50 % Infektionsrate überschreiten

2.2.4.15. Untersuchung des Neutralisationsmechanismus von mAk 2c

Um den Einfluss des mAk 2c auf die Bindung des Virus an die Zielzelle zu untersuchen, wurden im Rahmen eines Neutralisationstests abgestufte Konzentrationen des mAk 2c mit einer definierten Virusmenge von 100 TCID₅₀ vor („preattachment“) bzw. nach („postattachment“) der Inokulation der Vero-Zellen mit Herpesviren zur Reaktion gebracht. Um die neutralisierende Aktivität des mAk 2c vor der Bindung des Virus an die Zielzelle zu untersuchen, wurde eine definierte Virusmenge von TCID₅₀ HSV-1 F bei 4°C mit abgestuften Antikörperkonzentrationen des mAk 2c (0,98-125 nM) oder von polyklonalem humanen IgG (Intratect[®], 326 nM – 41666 nM) für die Dauer von einer Stunde inkubiert und im Anschluss mit vorgekühlten Vero-Zellen (4°C, 15 min) zur Reaktion gebracht. Zum Vergleich der antiviralen Wirkung des mAk 2c nach bereits erfolgter Bindung an die Zielzelle erfolgte die Antikörpergabe nach Inokulation der vorgekühlte Vero-Zellen mit einer entsprechenden Viruslast bei 4°C für die Dauer von einer Stunde. Dadurch wurde eine Bindung der Virionen an Zielantigene induziert ohne eine Penetration zu ermöglichen. Beide Ansätze wurden für eine weitere Stunde bei 4°C und anschließend für 72 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.4.16. Kreuzvernetzung neutralisierender 2c-Fab-Fragmente

Um zu klären, ob das antivirale Potential monovalenter 2c-Fab-Fragmente durch Kreuzvernetzung wiederhergestellt werden kann, wurde ein modifizierter Neutralisationstest durchgeführt. Monovalente 2c-Fab-Fragmente wurden in steigenden Verdünnungen (3000 nM– 23 nM) mit einer jeweils konstanten Virusmenge (100 TCID₅₀) HSV-1 F für 1 h bei 37°C inkubiert. In einem parallelen Ansatz wurde das 2c-Fab-Virus-Gemisch mit einem Überschuss (2600 nM) des kreuzvernetzenden Ziege-Anti-Maus, F(ab')₂-spezifischen Antikörpers versetzt. Um eine unspezifische, neutralisierende Wirkung ausschließen zu können wurde in einem dritten Ansatz der kreuzvernetzende Antikörper ohne Beigabe neutralisierender Antikörper mit dem Herpesvirus inkubiert. Der Neutralisationstiter wurde wie unter 2.2.4.14 beschrieben, bestimmt.

2.2.4.17. Aktivierung der komplementabhängigen Zytotoxizität (CDC)

Um die Frage zu klären, ob eine Komplementabhängigkeit des Neutralisationspotentials der monoklonalen Antikörper mAk 2c und mAk hu2c V1 besteht, wurde ein zelladaptierter Plaque-Reduktionsassay durchgeführt. Dazu wurde eine konstante Virusmenge von 5 x 10⁵ PFU der Virusstämme HSV-1 F ΔgE bzw. der daraus generierten Revertante HSV-1 F rev

mit jeweils 1 µg der neutralisierenden Antikörper mAk 2c oder mAk hu2c V1 in einem Gesamtvolumen von 1800 µl Kulturmedium bei 37°C zur Reaktion gebracht. Als Referenz wurde das humane, polyklonale IgG-Präparat Cytotect (60mg/ml) mit einer Endkonzentration von 120 µg/ml eingesetzt. In einer Kontrollreaktion wurde das jeweilige Virus ohne neutralisierende Antikörper in Kulturmedium inkubiert. Ein Parallelansatz wurde entsprechende für alle Proben unter Zusatz von 10% eines humanen, IgG-depletierten Serums eines auf HSV-spezifische Antikörper negativ getesteten Spenders (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) als Komplementquelle durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten. Die beschriebenen Ansätze wurden danach als Triplets durch Überführung von jeweils 555 µl in die oberen Vertiefungen der 48-Loch-Platten verteilt. In die darunterliegenden Vertiefungen wurden jeweils 500 µl Kulturmedium vorgelegt. Beginnend bei der obersten Vertiefung wurde durch kontinuierliches Pipettieren von 50 µl in die jeweils darunterliegende Vertiefung eine 1:10 Verdünnungsreihe der Antikörper-Virus-Gemische hergestellt. Im Anschluss wurde das Inokulationsmedium der am Tag zuvor auf 48-Loch-Platten ausplattierten Vero-Zellen (80 % Konfluenz) verworfen und die verdünnten Proben auf die mit Vero-Zellen beschichteten Zellkulturplatten übertragen. Der Virustiter wurde durch Zählen der Plaques 36 Stunden nach Inokulation der Proben mit Hilfe eines Lichtmikroskops bestimmt. Die Quantifizierung der Plaques erfolgte ab derjenigen Log₁₀-Verdünnungsstufe, ab welcher die Plaqueanzahl eindeutig bestimmt werden konnte (Anzahl der Plaques = 0-10). Aus den drei korrespondierenden Werten einer Probe wurde der Mittelwert errechnet und unter Berücksichtigung der Log₁₀-Verdünnungsstufe der Titer nach folgendem Schema bestimmt:

		Antikörper-Virus-Gemisch		
<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Log₁₀-Verdünnung</div> <div style="margin-left: 5px;">↓</div> </div>	10 ⁵	X	X	X
	10 ⁴	X	X	X
	10 ³	X	X	X
	10 ²	X	X	X
	10 ¹	X	X	X
	m = 4	5	4	3

X = ausgeprägter CPE, Plaques nicht quantifizierbar; m = Mittelwert der drei korrespondierenden Werte einer Probe. Der resultierende Titer entspricht folglich 4 x 10⁵ PFU/ml.

2.2.4.18. Untersuchung Inhibition der mAk 2c- bzw. mAk hu2c V1-vermittelten Effektorzell-Aktivierung durch den HSV-gE/gI-Komplex

Infolge der Interaktion des HSV-gE/gI-Komplexes mit der IgG-Fc-Domäne wird die Bindung von neutralisierenden Antikörpern an Fcγ-Rezeptoren blockiert und die damit assoziierte Aktivierung von Effektorzellen inhibiert, was zu einer Abschwächung der Immunantwort führen kann. Die Auswirkung dieser Interaktion auf die Effektorzell-Aktivierung durch mAk 2c und mAk hu2c V1 wurde mit Hilfe eines Reporterassays in Kooperation mit Prof. Hartmut Hengel (Universitätsklinikum Düsseldorf, Abteilung für Virologie) untersucht. Zu diesem Zweck wurden Vero-Zellen einer 80-90 %-igen Konfluenz mit 2 MOI der Virusstämme HSV-1 F ΔgE bzw. der daraus generierten Revertante HSV-1 F rev in 96-Loch-Platten infiziert. Durch zusätzliche Zentrifugation der Platten (15 min, 800 x g) konnte die Infektion optimiert werden. Am Folgetag wurde das Inokulationsmedium verworfen und die Zellen mit neutralisierenden Antikörpern in einer 1:2 Verdünnungsreihe in Kulturmedium für 30 min inkubiert. Der Ansatz wurde in Triplets durchgeführt. Im Anschluss an die Antikörper-Inkubation wurde der Überstand verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit je 100 µl RPMI-Komplettmedium (10 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) wurden die Vero-Zellen mit einer Suspension von 2×10^5 Zellen/ 100 µl der entsprechenden BW5147-Reporterzellen überschichtet. Die Zellkulturplatten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Parallel dazu wurde eine entsprechende Anzahl an 96-Well-Platten mit 50 µl/Vertiefung eines Ratte-anti-Maus-IL-2-spezifischen Antikörpers beschichtet, welcher 1:500 im Bindepuffer (0.1 M Na₂HPO₄ pH 9.0) verdünnt war. Um eine Verdunstung zu verhindern, wurden die Platten mit Frischhaltefolie bedeckt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen auf den beschichteten ELISA-Platten wurden durch Inkubation mit Blockpuffer (PBS, 10% FCS) für die Dauer von 1h geblockt. Zur Permeabilisierung der IL-2 produzierenden BW5147-Reporterzellen wurden die Zellkultur-Platten aus dem Brutschrank entnommen, mit 100 µl/Vertiefung Probenpuffer (PBS, 10%FSC, 0,05% TWEEN) versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 100 µl des Überstandes wurden in entsprechender Reihenfolge auf die beschichteten ELISA-Platten übertragen. Nach 2 Stunden wurde der Überstand verworfen, die Platten zweimal mit 100 µl Waschpuffer (PBS, 0,05 % TWEEN) gewaschen und nach Zugabe von 50 µl des Ratte-anti-IL-2-Biotin-konjugierten Detektionsantikörpers (1:500 in Probenpuffer verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Platten mit 50 µl/Vertiefung Peroxidase-konjugierten Streptavidin (1:1000 in Probenpuffer verdünnt) für 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die ELISA-Platten mit 50

µl/Vertiefung Ultra-TMB Substratlösung versetzt. Nach 4 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl/Vertiefung der Stopplösung (1 M H₂SO₄) unterbrochen. Als Referenz wurde der Versuch in einem zweiten Ansatz unter Verwendung des polyklonalen IgG-Präparates Cytotect durchgeführt. Die Aktivierung der Fcγ-Rezeptoren durch spezifisch an HSV-Antigene gebundene Antikörper wurde mit Hilfe des HSV-unspezifischen anti-RSV-Antikörpers Synagis als Kontrolle geprüft. Das Auftreten von unspezifischen Bindungen wurde durch Bindungsanalyse der Antikörper gegenüber untransfizierten, nativen BW5147-Reporterzellen untersucht. Um die ermittelten Werte in Relation setzen zu können, wurden die BW5147-Reporterzellen durch Fcγ-Rezeptor-spezifische Antikörper stimuliert und die in diesem System gemessene IL-2 Produktion als 100% bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 96-Loch-Platten mit spezifischen, gegen die Fcγ-Rezeptoren gerichteten Antikörpern beschichtet und anschließend mit den BW-Zellen wie zuvor beschrieben co-kultiviert. Die IL-2 Expression wurde nach 24 Stunden quantifiziert. Die Messung erfolgte im GENios Plus ELISA-System (Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Das Referenzsignal wurde bei 620 nm bestimmt.

2.2.5. Bioinformatische Methoden

2.2.5.1. Humanisierung des murinen monoklonalen Antikörpers 2c

Mit dem Ziel der klinischen Nutzbarmachung des mAk 2c als therapeutisches Reagenz wurden ein chimärer und vier Varianten eines humanisierten Antikörpers generiert. Durch dieses Verfahren konnten die biophysikalischen Eigenschaften des parentalen Antikörpers beibehalten und die Immunogenität auf ein Minimum reduziert werden. Zu diesem Zweck wurden die authentischen Gene der variablen leichten (V_L) und variablen schweren Kette (V_H) mittels RACE-PCR (2.2.1.4) amplifiziert und durch Aminosäuresequenz-Abgleich mit der Kabat-Datenbank (106) eindeutig der entsprechenden Subgruppe zugeordnet. Um den Anteil nicht-humaner, die Immunogenität vermittelnder Sequenzanteile zu verringern, wurde ein chimärer IgG1-Antikörper (mAk ch2c), bestehend aus humanen konstanten und murinen variablen Regionen generiert. Zu diesem Zweck wurden die V_H- und V_L-Gene in von unserem Kooperationspartner Dr. Grosse-Hovest (Universität Tübingen) hergestellte Expressionsvektoren, die die humanen konstanten Genabschnitte der leichten Kette bzw. der schweren Kette des IgG1-Isotyps enthielten, kloniert und nach stabiler Transfektion in die murine Myelom-Zelllinie Sp2/0 zur Expression gebracht. Zur weiteren Reduktion der potentiellen Immunogenität wurde der murine Antikörper durch das „CDR-grafting“ (105)

humanisiert. Zu diesem Zweck wurden zunächst die V_H- und V_L-Sequenzen nach Kabat nummeriert (106). Nach eindeutiger Identifikation der die Antigenbindungsstelle formierenden hypervariablen Regionen („Complementarity Determining Regions“, CDRs) wurden diese in geeignete Keimbahn-Akzeptorgerüste („Framework Regions“, FR) „transplantiert“. Diese wurden zuvor durch Sequenz-Abgleich der murinen V_H- und V_L-Sequenzen gegen humane Keimbahnsequenzen mit Hilfe der Datenbank V-Base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) ermittelt. Dabei wurde insbesondere auf eine möglichst hohe Sequenz-Identität geachtet. Die Analyse der J-Gene erfolgte manuell mit dem Programm VectorNTI. Um die Antigenbindungseigenschaften des Antikörpers beizubehalten, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. C.R. Martin (University College London, Department of Biochemistry and Molecular Biology) kritische Aminosäurepositionen innerhalb der humanen FR-Regionen bestimmt und zur murinen Sequenz hin rückmutiert. Mit der Synthese der humanisierten DNA-Moleküle wurde die Firma Entelechon (Regensburg) beauftragt. Die Sequenzen wurden auf Nukleotid-Ebene durch Codon-Optimierung an eukaryotisches Translationssystem *Mus musculus* angepasst. Durch die Wahl geeigneter Primer und die Durchführung einer überlappenden PCR konnten weitere sukzessive Rückmutationen in die V_H- und V_L-Gensequenzen eingefügt werden. Die Fusionierung der murinen bzw. humanisierten V_H- und V_L-Gene mit konstanten Schwer- bzw. Leichtketten-Genen (C_H1-3 und C_κ) mittels PCR, Klonierung in geeignete, patentierte IgG1-Expressionsvektoren und die Transfektion der SP2/0-Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Ludger Große-Hovest (Universität Tübingen, Abteilung für Immunologie).

2.2.6. Tierexperimente

2.2.6.1. Infektion von NOD/SCID-Mäusen mit Herpesviren

Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale (i.p) Gabe der Anästhetika Ketamin (50 mg/kg) und Xylazin (20 mg/kg) in einem Gesamtvolumen von 200 µl betäubt. Während der 30-40-minutigen Betäubung wurden die Versuchstiere durch Inokulation von 1×10^6 TCID₅₀ des jeweiligen Herpesvirus-Stocks auf die Vaginalschleimhaut infiziert. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Vaginalschleimhaut mit Hilfe eines sterilen autoklavierten Wattestäbchens von dem Vaginalsekret gereinigt. Die anschließende Infektion erfolgte durch Auftragen von 20 µl des Herpesvirus-Stocks auf die Vaginalschleimhaut mit Hilfe einer Pipette (82, 146). Um das Herauslaufen der Virusprobe zu verhindern, wurde die Vagina mit

dem Epiglu Hautklebstoff benetzt. Die Mäuse wurden über einen Beobachtungszeitraum von 30 Tagen regelmäßig auf Gewichtsverlust und das Auftreten neuronaler Schädigungen (Lähmungen der Hinterbeine) inspiziert.

2.2.6.2. Passive Immunisierung

Die Effizienz des mAk 2c bzw. des humanisierten Antikörpers mAk hu2c V1 zur Protektion der Mäuse vor einer HSV-Infektion wurde durch präexpositionelle Verabreichung unterschiedlicher Antikörperdosen (100 µg – 300 µg) untersucht. Die Kontrollgruppe wurde mit PBS behandelt. Die Applikation der Antikörper erfolgte nach Fixierung der Mäuse in einer speziell dafür vorgesehenen Vorrichtung und kurzer Bestrahlung des Schwanzes mit einer Rotlichtlampe 24 Stunden vor Infektion durch intravenöse (i.v.) Injektion in die Schwanzvene. Zur Infektion (2.2.6.1) wurde eine Virusmenge von 1×10^6 TCID₅₀ des Stammes HSV-1 F eingesetzt. Der Infektionsverlauf wurde durch Entnahme von Vaginalabstrichen verfolgt. Virusproben von der vaginalen Schleimhaut wurden nach kurzzeitiger Betäubung der Mäuse mittels Isofluran (Delta Select GmbH) durch Spülung Vagina mit 20 µl PBS an den Tagen 1, 2, 4, 6, 8 und am Tag der Tötung entnommen. Die Proben werden bei -80°C aufbewahrt. Anschließend wird der Virustiter mittels Endpunkttitrationsverfahren (2.2.4.13) untersucht.

2.2.6.3. Postexpositionsprophylaktische Behandlung nach Infektion mit HSV-1 F

Immundefiziente Mäuse wurden mit einer Virusdosis von 1×10^6 TCID₅₀ des Laborstammes HSV-1 F intravaginal (2.2.6.1) infiziert. Die Applikation der Antikörper erfolgte durch dreimalige Gabe von 300 µg Antikörper/Maus zu den Zeitpunkten 24, 40 und 56 Stunden nach Infektion. Die Kontrollgruppe wurde entsprechend mit PBS behandelt. Der Infektionsverlauf wurde durch regelmäßige Erfassung der Symptomatik und Bestimmung der Viruslast im Sekret der Vaginalschleimhaut (2.2.4.13) protokolliert. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über die Dauer von 30 Tagen.

2.2.6.4. Postexpositionsprophylaktische Behandlung nach Infektion mit HSV-1 R10.2

Bei diesem Experiment wurden die Versuchstiere mit dem aus Patienten isolierten, gegenüber den Virusstatika ACV, PFA und CDV vermindert sensitiven Virusstamm HSV-1 R10.2 intravaginal mit einer Virusdosis von 1×10^6 TCID₅₀ infiziert. Die Applikation des humanisierten Antikörpers hu2c erfolgte 24, 40 und 56 Stunden nach Infektion. Zur

Kontrolle wurden Versuchstiere entweder mit PBS oder mit Aciclovir behandelt. Die Gabe von PBS wurde entsprechende der Applikation des humanisierten Antikörpers durchgeführt. ACV wurde mit Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht zweimal täglich im Abstand von 12 Stunden i.p. verabreicht (62, 81, 159). Die Versuchstiere standen für die Dauer von 30 Tagen unter Beobachtung.

3. Ergebnisse

3.1. Produktion des mAk 2c und dessen Derivate F(ab')₂, Fab und scFv

Zur Untersuchung des Einflusses der Anzahl der Antigenbindungsstellen (Antikörpervalenz) und der Bedeutung des Fc-Fragments auf die HSV-neutralisierenden Eigenschaften des gB-spezifischen mAk 2c wurde der murine monoklonale Antikörper (mAk) 2c quantitativ produziert. Anschließend wurden durch konventionellen Proteaseverdau des mAk 2c die Antikörperfragmente 2c-Fab und 2c-F(ab')₂ generiert. Desweiteren wurde ein scFv-Fragment von mAk 2c, welches die kleinste vollständige Antigenbindungseinheit eines IgG-Antikörpers darstellt, rekombinant hergestellt.

3.1.1. Produktion und Aufreinigung des mAk 2c

Die den mAk 2c sezernierende Hybridomzelllinie 2c wurde zunächst unter serumhaltigen Bedingungen in Standardmedium kultiviert und auf ein Gesamtvolumen von 1L expandiert. Da eine proteinbiochemische Abtrennung der im fötalen Kälberserum enthaltenen Immunglobuline von dem mAk 2c nicht möglich ist, wurden die Hybridomzellen im Anschluss in serumfreies, synthetisches Zellkulturmedium umgesetzt. Der Zellkulturüberstand wurde bei einer Zellvitalität von 20% nach ca. 8-10 Tagen geerntet.

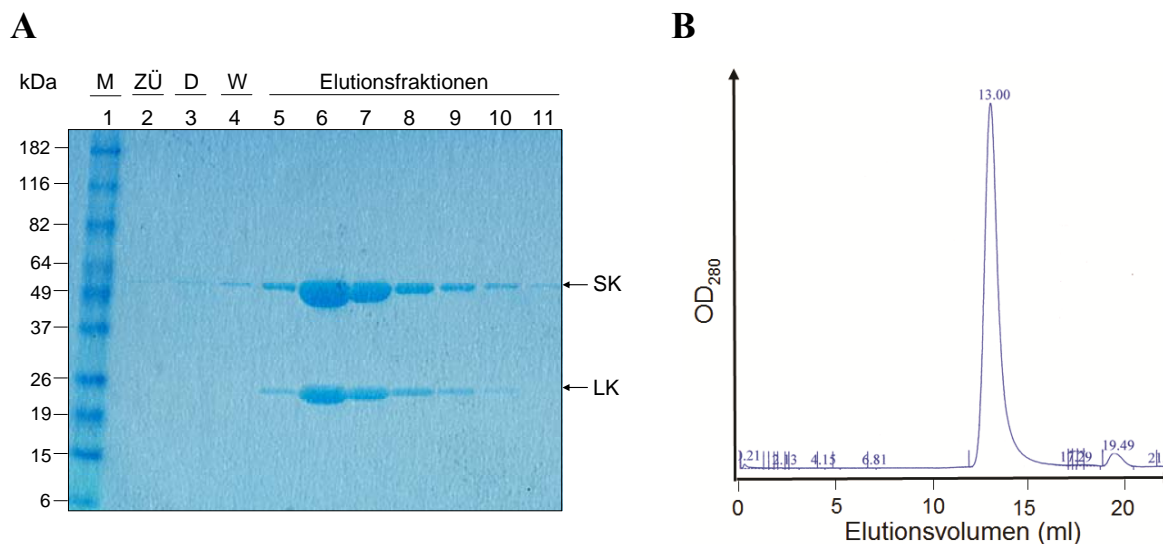


Abb. 15: Analyse des mAk 2c nach quantitativer Aufreinigung mittels Protein-A aus 1L Zellkultur-Überständen. (A) Reduzierendes SDS-Gel (4-20%) nach Coomassiefärbung: Angabe der Molekulargewichte in kDa; 1 = Marker (M), 2 = Zellkultur-Überstand (ZÜ), 3 = Durchfluss der Protein-A-Säule (D), 4 = Waschschrift mit Protein-A-Bindepuffer (W), 5-11 Elutionsfraktionen. (B) Analytische Größenausschlusschromatographie der vereinten mAk 2c Elutionsfraktionen 6-9 mittels einer Superdex 200 10/300 GL Säule. Die Reinheit des mAk 2c wurde mit der Unicorn FPLC-Software bestimmt und betrug > 97%. SK = schwere Kette; LK = leichte Kette (50 bzw. 25 kDa unter reduzierenden Bedingungen).

Zur Anreicherung des mAk 2c wurde der Zellkulturüberstand im Verhältnis 1:1 mit Protein-A-Bindepuffer versetzt und über eine äquilibrierte Protein-A-Sepharose-Säule geleitet. Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Coomassiefärbung überprüft. Die SDS-PAGE zeigt in den Elutionsfraktionen 5-11 jeweils zwei Proteinbanden, die unter reduzierenden Bedingungen aufgrund der Proteingröße von 50 kDa bzw. 25 kDa der Schwer- bzw. Leichtkette entsprechen (Abb. 15A). Die Proteinreinheit der gepoolten Fraktionen 6-9 wurde durch analytische Gelfiltration mit Hilfe einer unter Standardbedingungen kalibrierten Superdex 200 10/300 GL Säule überprüft. Das Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie zeigt, dass der mAk 2c mit hohem Reinheitsgrad, ohne weitere Proteinkontamination eluiert werden konnte (Abb. 15B). Die Ausbeute betrug durchschnittlich 10 mg mAk 2c aus 1 L Zellkulturüberstand.

3.1.2. Generierung und Aufreinigung der mAk-2c Derivate 2c-Fab und 2c-F(ab')₂

Zur proteolytischen Herstellung der 2c-Fab- und F(ab')₂-Fragmente wurden jeweils 10 mg des mAk 2c entsprechend mit dem Enzym Papain oder Pepsin verdaut. Nach Papain-Verdau erfolgte eine Abtrennung der 2c-Fab-Fragmente von abgespaltenen Fc-Fragmenten und unverdaulichem IgG mittels Protein-A-Chromatographie. Die Reinheit der generierten 2c-Fab-Fragmente wurde mittels SDS-PAGE und analytischer Größenausschlusschromatographie unter Verwendung einer zuvor mit Größenstandards kalibrierten Superdex 200 10/300 GL Säule verifiziert (Abb. 16). Insgesamt konnten 1,2–2 mg 2c-Fab-Fragmente aus 10 mg mAk 2c mit einer Reinheit von 96% hergestellt werden.

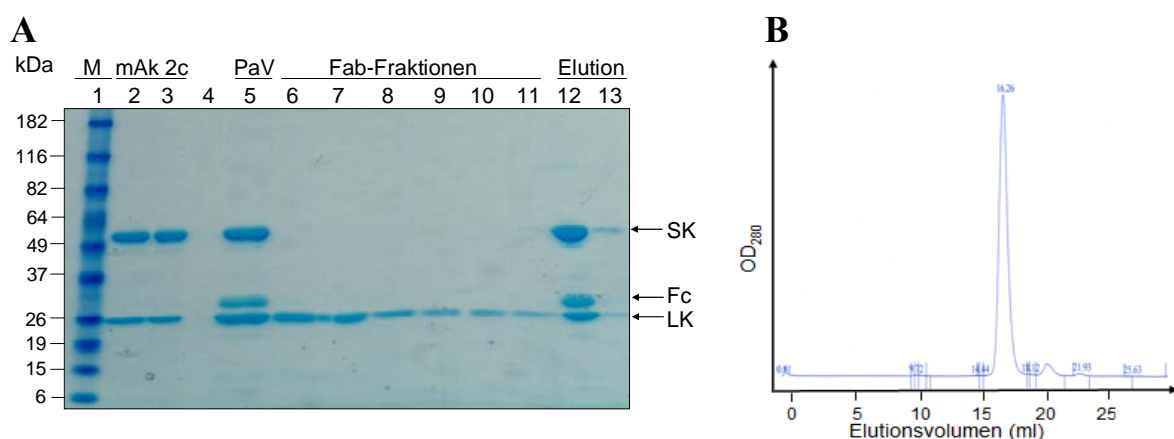


Abb. 16: Analyse der durch Papain-Verdau des mAk 2c generierten 2c-Fab-Fragmente nach Aufreinigung mittels Protein-A. (A) Reduzierendes SDS-Gel (4-20%) nach Coomassiefärbung: 2 = mAk 2c in PBS, 3 = mAk 2c in Fab-Puffer (PIERCE), 5 = mAk 2c nach Papain-Verdau (PaV); 6-11 = 2c-Fab-enthaltende Durchflussfraktionen nach Protein-A-Chromatographie; 12-13 = eluierte Fraktionen (unverdautes Protein und Fc-Fragmente). **(B)** Analytische Größenausschlusschromatographie der vereinten Durchflussfraktionen 6-11. Die Reinheit der 2c-Fab-Fragmente betrug 96%. SK = schwere Kette ; LK = leichte Kette; Fc = IgG-Fc-Domäne.

Bei einer Pepsin-induzierten Spaltung eines IgG-Moleküls entstehen neben $F(ab')_2$ -Fragmenten und vollständigen Fc-Fragmenten zusätzlich mehrfach gespaltene Fc-Fragmente und Fab-Fragmente. Die Abtrennung der IgG-Moleküle und der vollständigen Fc-Fragmente erfolgte analog der 2c-Fab-Fragment-Aufreinigung durch Protein-A-Chromatographie (Abb. 17A). Die Abtrennung der 2c- $F(ab')_2$ -Fragmente von den im Durchfluss der Protein-A-Säule ebenfalls enthaltenen 2c-Fab-Fragmenten und Fc-Abbauprodukten erfolgte über eine präparative HiLoad Superdex 200 16/60 Säule mittels Größenausschlußchromatographie. Das Elutionsprofil in Abb. 17B zeigt, dass die $F(ab')_2$ -Fragmente von den unerwünschten Nebenprodukten separiert werden konnten. Die Ausbeute betrug 1-1,5 mg 2c- $F(ab')_2$ -Fragmente aus 10 mg mAk 2c bei einer 95%-igen Reinheit.

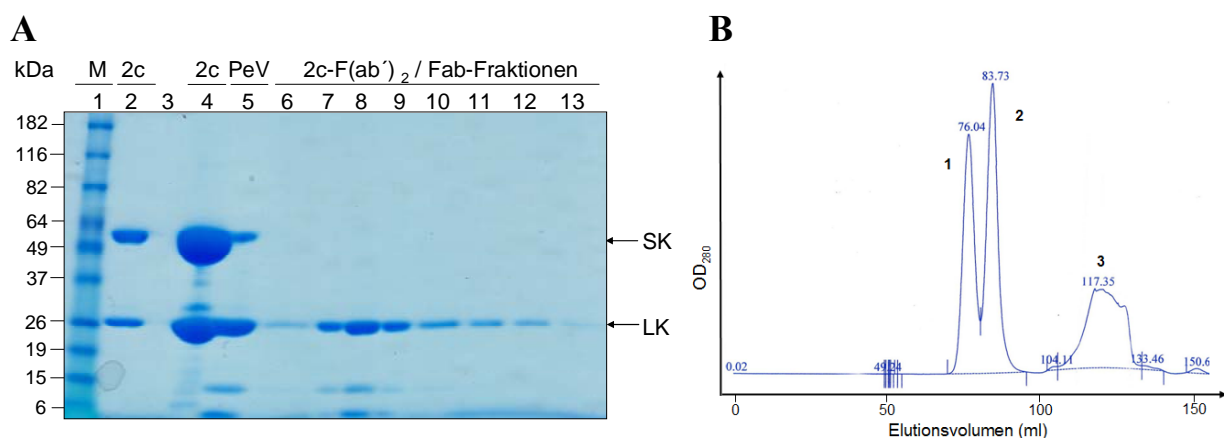


Abb. 17: Aufreinigung der durch Pepsin-Spaltung des mAk 2c generierten 2c- $F(ab')_2$ -Fragmente. (A) Reduzierendes SDS-Gel (4-20%) nach Coomassiefärbung: 2 = mAk 2c in PBS, 4 = einkonzentrierter mAk 2c; 5 = mAk 2c nach Pepsin-Verdau (PeV); 6-11 = 2c-Fab/ $F(ab')_2$ -Durchflussfraktionen nach Protein-A-Chromatographie. (B) Elutionsprofil der Größenausschlußchromatographie der vereinten Fraktionen 6-13. Die ca. 110 kDa großen 2c- $F(ab')_2$ -Fragmente (Elutionspeak 1) konnten von den 50 kDa großen 2c-Fab-Fragmenten (Elutionspeak 2) und den kleinverdauten Fc-Abbauprodukten (Elutionspeak 3) getrennt werden. SK = schwere Kette; LK = leichte Kette.

3.1.3. Generierung und Produktion des 2c-scFv

3.1.3.1. Bestimmung der authentischen V_H - und V_L -Sequenzen

Die Herstellung eines monovalenten Antikörpers im scFv-Format zur vergleichenden Analyse mit dem mAk 2c, dem 2c-Fab- und 2c- $F(ab')_2$ -Fragmenten, sowie der Chimärisierungs- und Humanisierungsprozess erforderten die Identifikation der authentischen Gensequenzen der variablen schweren Kette (V_H) und der variablen leichten Kette (V_L) des mAk 2c. Zu diesem Zweck wurde mRNA aus der 2c-Hybridomzelllinie isoliert und cDNA mittels Reverser Transkriptase hergestellt. Die authentischen Sequenzen der V_L - und V_H -Gene konnten nach Auswahl geeigneter 3'-Primer in der jeweils konservierten CH1-Region (Primer CH1) der schweren Kette bzw. C κ -Region (Primer C- κ -Maus) der leichten Kette mittels 5'-RACE-PCR

(2.2.1.4) amplifiziert werden. Durch Subklonierung der Amplifikationsprodukte in den Sequenzierungsvektor pCR 2.1 TOPO wurden die Gensequenzen von V_H und V_L bestimmt. Zur späteren Humanisierung des murinen mAk 2c wurden für beide variablen Domänen die Hypervariablen Regionen (CDRs) und die Framework-Regionen (FRs) nach Definition von Kabat (106) bestimmt (Abb.18).

2cVH

Q	V	T	L	K	E	S	G	P	G	I	L	L	P	S	Q	T	L	S	L	T	C	S
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
CDR1																						
F	S	G	F	S	L	S	T	S	G	M	S	V	G	W	I	R	Q	P	S	G	K	G
24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	35A	35B	36	37	38	39	40	41	42	43	44
CDR2																						
L	E	W	L	G	H	I	W	W	N	N	D	K	Y	Y	K	P	A	L	K	S	R	L
45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
T	I	S	K	D	T	S	N	K	Q	V	F	L	K	I	A	S	V	V	T	A	D	T
68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82A	82B	82C	83	84	85	86	87
CDR3																						
A	T	Y	Y	C	A	R	I	Y	Y	G	Y	R	P	Y	A	M	D	Y	W	G	Q	G
88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100A	100B	100C	100D	101	102	103	104	105	106
T	S	V	T	V	S	S																
107	108	109	110	111	112	113																

2cVL

D	V	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
CDR1																						
R	S	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	Q	K	P	G
24	25	26	27	27A	27B	27C	27D	27E	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
CDR2																						
Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G
42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64
S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	G	T
65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	68	69
CDR3																						
D	F	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S
70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92
H	V	P	W	S	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	R							
93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108							

Abb. 18: Aminosäuresequenzen der V_H - und V_L -Domänen des mAk 2c. Die Nummerierung der Aminosäuresequenz und die Bestimmung der Hypervariablen Regionen (CDRs) erfolgte nach Kabat (106). Die entsprechenden DNA-Sequenzen sind im Anhang gelistet.

Zur Bestimmung der Subgruppen von V_H und V_L wurden die ermittelten N-terminalen Aminosäuresequenzen der ersten 8 Aminosäuren mit entsprechenden Sequenzen variabler Domänen aus der Kabat-Datenbank (106) abgeglichen (Tab. 12). Hierbei konnte die variable Schwerekette der Subgruppe IB und die variable Leichtkette der Subgruppe des Isotyps Kappa (κ) II zugeordnet werden (Tab. 12).

Tab. 12: Bestimmung der Subgruppenzugehörigkeit der V-Domänen von mAk 2c.

Murine variable schwere Kette		Murine variable leichte Kette	
Subgruppe	5'FR-1 Sequenz	Subgruppe	5'FR-1 Sequenz
IA	EVQLQESG	Kappa I	DIVMTQSPT
IB	QVQLKESG	Kappa II	DVVMQTPL
IIA	EVQLQQSG	Kappa III	DIVLTQSPA
IIB	QVQLQQPG	Kappa IV	ENVLTQSPA
IIC	EVQLQQSG	Kappa V	DIQMTQTTS
IIIA	EVKLVESG	Kappa V_{MOPC21}	NIVMTQSPK
IIIB	EVKLLESG	Kappa VI	EIVLTQSPA
IIIC	EVKLEESG	Kappa VII	ETTVTQSPA
IIID	EVHLVESG		
mAk 2c	QVTLKESG		DVLMQTPL

3.1.3.2. Klonierung und bakterielle Expression des scFv

Zur Konstruktion des rekombinanten 2c-scFv-Antikörperfragments wurden die für V_H und V_L kodierenden Gene der variablen Domänen durch ein für ein synthetisches $(Gly_4Ser)_3$ -Linkerpeptid kodierendes Gen gentechnisch miteinander verknüpft und anschließend in den bakteriellen Expressionsvektor pHOG21 kloniert. Hierzu wurde die V_H -Gensequenz mit den Primern 2cVH#3up und 2cVH#4-do und die V_L -Gensequenz mit den Primern 2cVL#3up und 2cVL#4-do mittels PCR amplifiziert, wobei durch die beiden Primer 2cVH#4-do bzw. 2cVL#3-up jeweils ein Teil der $(Gly_4Ser)_3$ -Linkersequenz eingefügt wurde (Abb. 19.1). Durch die beiden Primer 2cVH#3up und 2cVL#4-do wurden N-terminal der V_H -Domäne eine NcoI-Restriktionsschnittstelle bzw. C-terminal der V_L -Domäne eine BamHI-Restriktionsschnittstelle eingeführt. Durch überlappende PCR (Abb. 19.2) unter Verwendung der Primer 2cVH#3up und 2cVL#4-do wurden die modifizierten V_H - und V_L -Gene zu einem 2c-scFv zusammengesetzt (Abb. 19.3) und über die Restriktionsschnittstellen NcoI und BamHI in den Vektor pHOG21 kloniert. Die korrekte Gensequenz des 2c-scFv wurde durch Sequenzierung bestätigt.

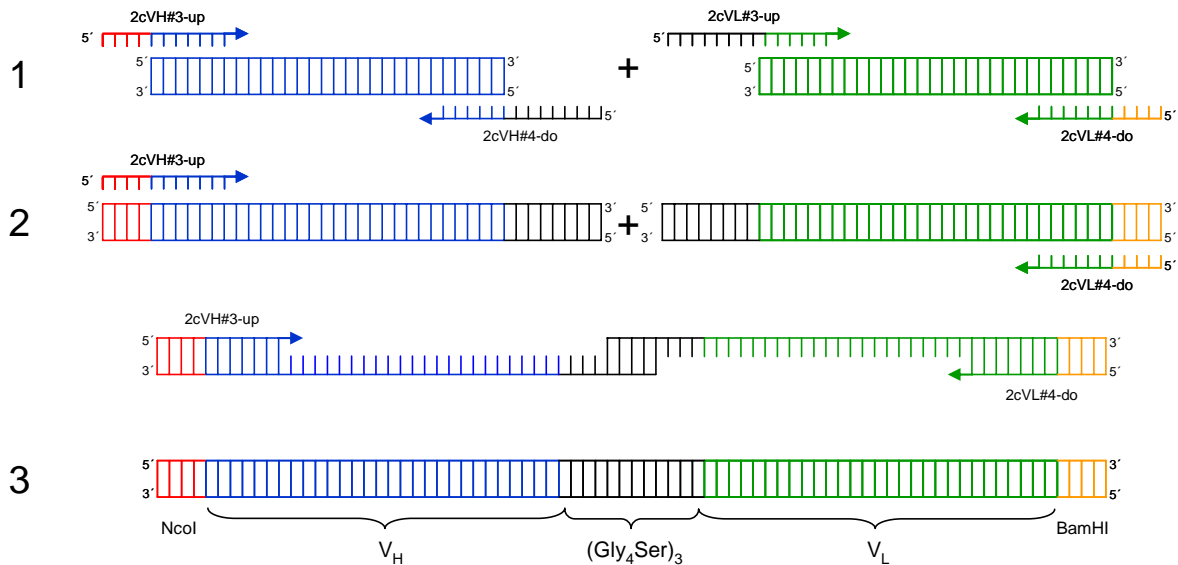


Abb. 19: Schematische Darstellung der Klonierung des 2c-scFv-Gens. (1) Einführung der Linker-Teilsequenzen und Restriktionsschnittstellen durch Amplifikation der V_H- und V_L-Sequenzen mit geeigneten Primern. (2) Zusammensetzung der modifizierten V_H- und V_L-Gensequenzen zu einem 2c-scFv-Fragment durch Überlappende PCR zur Generierung des vollständigen 2c-scFv-Genkonstruktes. (3) NcoI und BamHI = Restriktionsschnittstellen.

Zur löslichen Produktion des 2c-scFv in das Periplasma von *E.coli* wurden TG1-Bakterien mit dem Expressionsplasmid pHOG21-2c-scFv transformiert. Die Expression des 2c-scFv in einer 4L-Bakterienkultur wurde nach Erreichen einer optischen Dichte von 0,8 bei 600 nm (OD₆₀₀) durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) für die Dauer von 16-18 Stunden bei 21°C induziert. Nach Aufschluss des bakteriellen Periplasmas (2.2.2.1) wurde das 29 kDa große 2c-scFv-Antikörperfragment zunächst mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC, MatMet) angereichert und dabei weitgehend von bakteriellen Proteinen befreit (Abb. 20A, Bande 8). Zur weiteren Aufreinigung wurden die das rekombinante 2c-scFv-Protein enthaltenden IMAC-Fractionen (Abb. 20A Banden 7-10) vereinigt und mittels präparativer Größenausschlußchromatographie mit Hilfe einer Superdex GL 10/300 Säule aufgetrennt (Abb. 20B). Elutionsfraktionen der drei resultierenden Peaks wurden durch SDS-Gelelektrophorese (2.2.2.6) mit anschließender Coomassiefärbung und durch Western-Blot-Analyse (Abb. 20C) untersucht und konnten als bakterielles Protein (1), 2c-scFv (2) und 2c-scFv-Abbauprodukt (3) identifiziert werden. Die im Vergleich zur SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung sensitivere Western-Blot-Analyse zeigt, dass die 2c-scFv-Elutionsfraktionen auch nach der Auftrennung mittels Größenausschlußchromatographie teilweise noch das 2c-scFv-Abbauprodukt enthalten. Dies spricht für eine Neubildung des Abbauproduktes und damit für eine geringe Stabilität des 2c-scFv-Antikörperfragments (Abb. 20C).

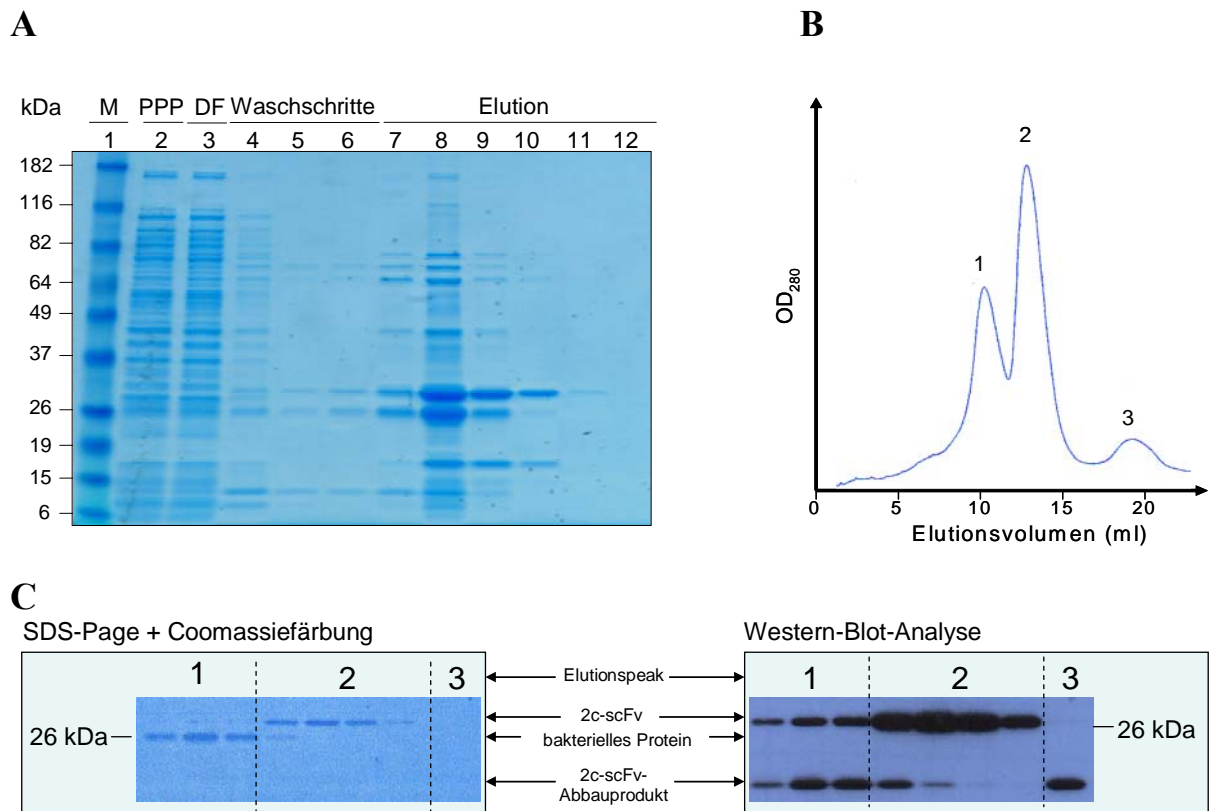


Abb. 20: Aufreinigung des 2c-scFv aus dem Periplasma von TG1 Bakterien. (A) Reduzierendes SDS-Gel (4-20%) nach Coomassiefärbung: Molekulargewichte sind in kDa angegeben; 2 = Periplasma-Präparation (PPP), 3 = Ni-NTA-IMAC Durchfluss, 4 – 6 = Waschschr. mit aufsteigenden Imidazol-Konzentrationen: 30 mM (4); 40 mM (5); 50 mM (6); 7-11 = 2c-scFv-haltige Elutionsfraktionen. (B) Elutionsprofil der vereinten Fraktionen 7-10 nach Größenausschlusschromatographie mit Hilfe einer kalibrierten Superdex 75 GL 10/300 Gelfiltrationssäule. Laufpuffer = PBS; Flussrate = 0,5 ml/min. (C) Analyse der durch Gelfiltration separierten Proteine der Elutionsfraktionen 1-3 mittels SDS-Gelelektrophorese mit einer nachfolgenden Coomassiefärbung bzw. Western-Blot-Analyse.

Durchschnittlich wurden mit der beschriebenen Produktionsstrategie mit ca. 10 µg des 2c-scFv-Antikörperfragments aus 4L Bakterienkultur relativ geringe Proteinmengen isoliert. Desweiteren konnte das 2c-scFv nicht zur Homogenität aufgereinigt werden, da eine chromatographische Trennung des 2c-scFv von dem bakteriellen Protein aufgrund ähnlicher Proteingrößen mittels der Größenausschlusschromatographie nicht vollständig erzielt werden konnte (Abb. 20B). Die Analyse der FPLC-Elutionsfraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese zeigte, dass die im Elutionspeak 2 enthaltenen 2c-scFv-Antikörperfragmente weiterhin mit bakteriellem Protein kontaminiert waren (Abb. 20C). Aus diesem Grund wurde unter Verwendung der biophysikalischen Eigenschaften des 2c-scFv eine alternative Aufreinigungsstrategie entwickelt. Hierzu wurde zunächst der isoelektrische Punkt (2.2.2.9) des 2c-scFv (PI = 7,4) ermittelt. Nach Anreicherung des 2c-scFv mittels IMAC konnte durch Ionenaustausch-Chromatographie mit Hilfe der Kationen-Austauschsäule MonoS GL5/50 (2.2.2.2) und anschließender Gelfiltration vollständig aufgereinigt werden. Die niedrige

Produktionsmenge in *E.coli* zum einen, und die hohen Proteinverluste bei den aufeinanderfolgenden Aufreinigungsschritten zum anderen machten die Etablierung einer alternativen Produktionsstrategie notwendig.

3.1.3.3. Eukaryontische Expression des 2-scFv-Antikörpers

Zur quantitativen Produktion des 2c-scFv wurde daher ein eukaryotisches Expressionssystem etabliert. Hierzu wurde das 2c-scFv Gen zunächst in den Zwischenklonierungs-Vektor pEUC6B durch Einfügen entsprechender Schnittstellen (ApaLI und BamHI) mittels PCR umklont (2.2.1.1). Dieser Vektor enthält eine zur Proteinsekretion in den Zellüberstand erforderliche Signalpeptid- und Kozak-Sequenz. Nach erneuter Sequenzierung wurde das Kozak-Signalpeptid-scFv-Genkonstrukt über zwei flankierende EcoRI-Schnittstellen von pEUC6B in den eukaryontischen Expressionsvektor pEE12 umklont (Abb. 21). Die Richtigkeit der Orientierung des 2c-scFv Gens nach Klonierung wurde durch Ansequenzierung des generierten Vektors (Primer pEE12S bzw. pEE12AS) bestätigt.

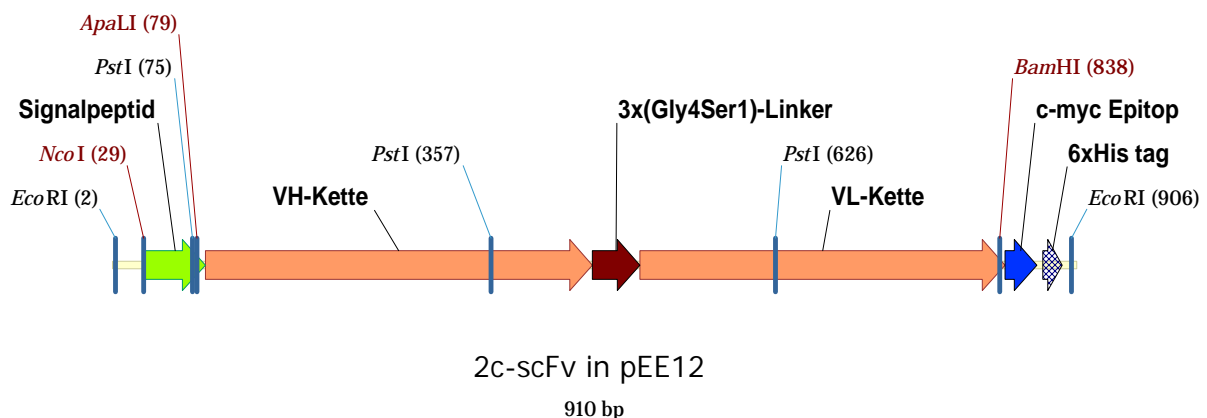


Abb. 21: Schematische Darstellung des 2c-scFv in dem Expressionsvektor pEE12. Die Fusion des 2c-scFv-Gens mit dem Signalpeptid und nachfolgende Klonierung in den pEE12 Vektor ermöglichte eine Produktion und anschließende Freisetzung des löslichen 2c-scFv-Antikörpers in den Zellüberstand von NS0-Säugerzellen.

Zur Expression des 2c-scFv-Antikörpers wurden NSO-Zellen mit dem linearisierten pEE12-scFv Plasmid transfiziert und stabile Einzelklone in einem glutaminfreien Medium selektioniert. Das 2c-scFv-Antikörperfragment wurde aus 1L Zellkulturüberstand eines selektionierten Einzelklons durch Ni-NTA-IMAC angereichert und anschließend durch Größenausschlußchromatographie zur Homogenität aufgereinigt. Das Elutionsprofil zeigte drei Hauptpeaks. Der scFv-Antikörper eluierte klar abgegrenzt von dessen Aggregaten bei 70,99 ml (Abb. 22). Die monomeren 2c-scFv-Fractionen wurden vereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Ausbeute an aufgereinigten 2c-scFv-

Antikörperfragment betrug 58,5 µg aus 1 L Zellkulturüberstand. Die Bindung des 2c-scFv an das gB-Antigen auf der Oberfläche infizierter Vero-Zellen konnte mittels FACS-Analyse (2.2.3.4) gezeigt werden.

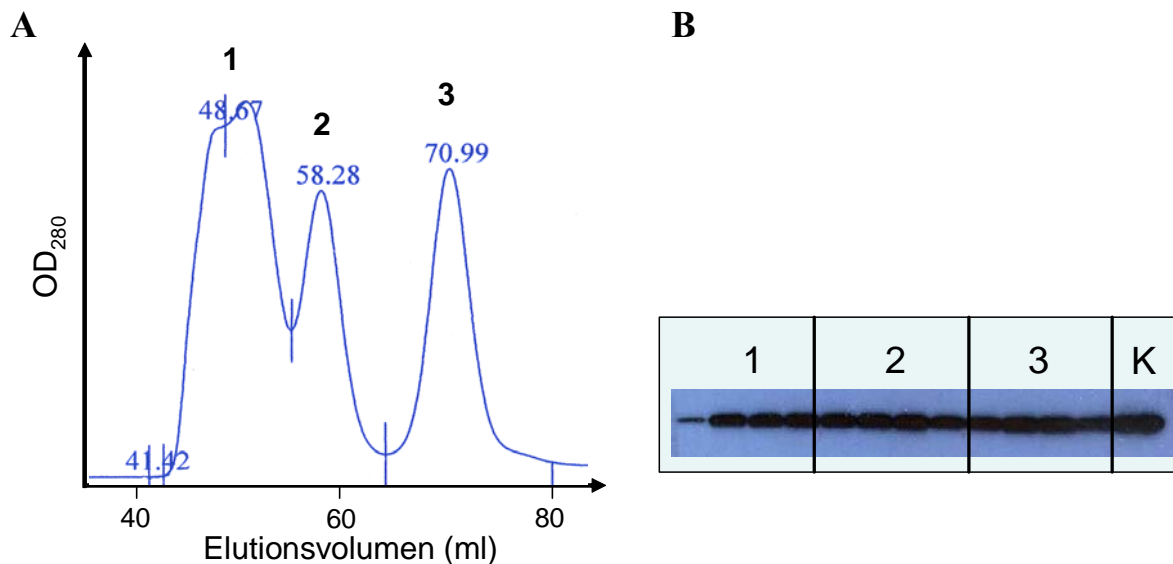


Abb. 22: Aufreinigung des 2c-scFv-Antikörpers aus NSO-Zellkulturüberständen. (A) Elutionsprofil der präparativen Gelfiltration des IMAC-aufgereinigten scFv-Antikörpers. Die Gelfiltration erfolgte mit einer Superdex 75 HL26/60 Säule in PBS bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die Elutionspeaks entsprechen Proteingrößenstandards von > 150 kDa (1), ca. 60 kDa (2) und ca. 30 kDa (3). (B) Analyse der FPLC-Fractionen der drei Elutionspeaks (1-3) mittels Western-Blot. Der rekombinante Antikörper 2c-scFv konnte in allen Peakfraktionen mittels eines anti-c-myc Antikörpers (9E10) nachgewiesen werden. Die eluierten Proteine konnten daher als 2c-scFv-Aggregate (1), Dimere (2) und Monomere (3) identifiziert werden.

3.2. Funktionelle in vitro Charakterisierung des mAk 2c und der 2c-Derivate

3.2.1. Charakterisierung des durch mAk 2c erkannten Epitops

Neuere kristallographische Untersuchungen der Ektodomäne des HSV-1 Glykoproteins gB zeigten eine homotrimere Organisation des gB und eine strukturelle Untergliederung eines jeweiligen Proteins in fünf Untereinheiten (Domänen I-V) (88). Das durch den mAk 2c erkannte gB-Epitop wurde in früheren Arbeiten bereits näher eingegrenzt (Eis-Hübinger *et al*, unveröffentlichte Daten). Die Untersuchungen zeigten, dass mAk 2c ein diskontinuierliches Epitop erkennt, das die Aminosäuren Y₃₀₃ bis E₃₀₅ und F₁₇₅ bis E₁₉₅ innerhalb der Domäne I (88) umfasst. Zur Bestätigung dieser Daten wurde die Reaktivität des mAk 2c gegenüber rekombinanten gB(730t)-Antigen (15) mittels Western-Blot-Analyse (2.2.2.7) unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht. Als Kontrollen wurden mAk H1817 (154), der ein kontinuierliches Epitop im Bereich der Domäne VI erkennt (15) und mAk H126 (122), der ein diskontinuierliches, teilweise mit dem 2c-Epitop überlappendes Epitop erkennt, eingesetzt.

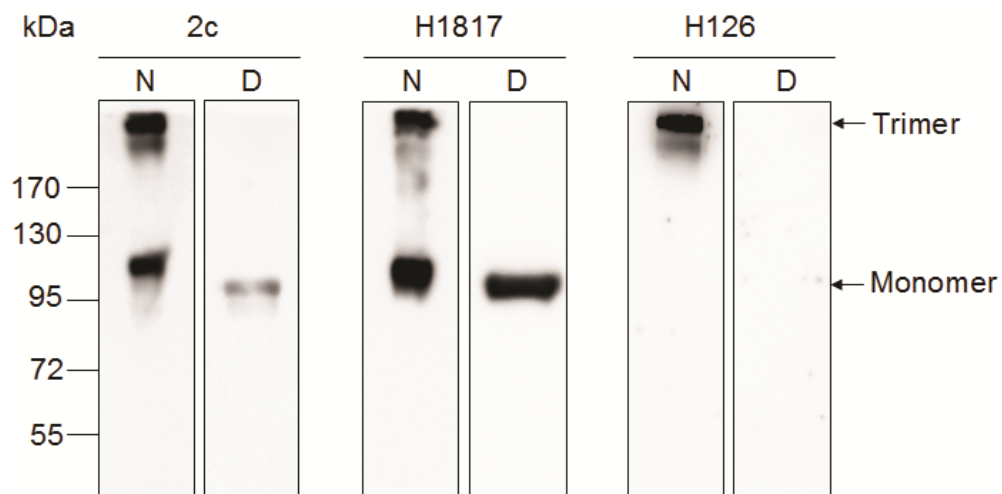


Abb. 23: Reaktivität des mAk 2c gegenüber HSV-1 gB. Rekombinantes gB(730t)-Antigen wurde mittels SDS-Gelelektrophorese entweder unter nichtreduzierenden (N) oder unter reduzierenden Bedingungen (D) aufgetrennt. Die Bindung des mAk 2c und der Kontrollen mAk H1817 bzw. mAk H126 wurden anschließend durch Western-Blot-Analyse untersucht. Das Molekulargewicht des mitgeführten Proteinmarkers ist in kDa und die Größe des gB entsprechend als Trimer bzw. Monomer angegeben.

Wie erwartet lieferte die Western-Blot-Analyse des mAk H1817 ein für ein lineares Epitop charakteristisches Bandenmuster (15). Eine Bindung des mAk H1817 konnte sowohl an das native gB-Protein (Trimer und Monomer) unter nicht-reduzierenden Bedingungen als auch an das denaturierte gB-Protein (Monomer) unter reduzierenden Bedingungen nachgewiesen

werden (Abb. 23). Im Vergleich dazu zeigte der mAk H126 nur unter nichtreduzierenden Bedingungen eine Reaktivität gegenüber der trimeren Form (> 170 kDa) des gB-Antigens. Dieses Ergebnis bestätigt nicht nur, dass mAk H126 ein Konformationsepitop erkennt, sondern deutet auch auf eine Trimer-Spezifität dieses Antikörpers hin. MAk 2c zeigte unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein ausgeprägtes Bindeverhalten an beide Formen des gB-Antigens (Trimer und Monomer) und war auch unter reduzierenden Bedingungen zur Bindung an die monomere gB-Form in der Lage. Die Reaktivität gegenüber dem gB-Monomer unter reduzierenden Bedingungen war jedoch im Vergleich mit mAk H1817 signifikant schwächer (Abb. 23). Das durch mAk 2c erkannte Epitop zeichnet sich folglich durch eine partielle Unempfindlichkeit gegenüber einer Denaturierung bzw. Konformationsänderung unter reduzierenden Bedingungen aus. In Anlehnung an Bindungsstudien mit Antikörpern, die sowohl unter reduzierenden als auch unter nichtreduzierenden Bedingungen vergleichbare Reaktivität gegenüber gB zeigten, kann das durch mAk 2c erkannte Epitop als „pseudokontinuierlich“ eingestuft werden (15).

3.2.2. Bestimmung der funktionellen Affinität

Die spezifische Bindung des mAk 2c und dessen Derivate 2c-F(ab')₂, 2c-Fab und 2c-scFv zur an HSV-1 F oder HSV-2 G infizierte Vero-Zellen wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen. Zur Bestimmung der funktionellen Affinität (Avidität) des mAk 2c-IgG und der davon abgeleiteten Antikörperfragmente wurde die Bindungsintensität unterschiedlicher Antikörperkonzentrationen gegenüber HSV-1 F infizierten Vero-Zellen bestimmt (2.2.3.5). Die daraus resultierende Berechnung der Gleichgewichtskonstanten K_D erfolgte nach der Marquardt-Levenberg Methode (6). Die Antikörper mAk 2c und 2c-F(ab')₂ zeichneten sich aufgrund ihrer bivalenten Antigenbindung durch eine 1,7 bzw. 2,7-fach höhere Affinität aus als die monovalenten Fragmente (Tab. 13). Die geringgradig höhere funktionelle Affinität der 2c-F(ab')₂-Fragmente im Vergleich mit dem parentalen mAk 2c (Tab. 13) ist wahrscheinlich auf eine höhere Flexibilität der Antigenbindestellen innerhalb des 2c-F(ab')₂-Moleküls zurückzuführen.

Das Glykoprotein B weist eine hochkonservierte Sequenzhomologie zwischen HSV-1 und HSV-2 auf. Aus diesem Grund wurde die Gleichgewichtskonstante K_D für die Bindung des mAk 2c an HSV-2 G infizierte Vero-Zellen bestimmt (Tab. 13). Die Untersuchung zeigte, dass mAk 2c sowohl an HSV-1 als auch an HSV-2 infizierte Vero-Zellen mit einer funktionellen Affinität von 10 nM bindet. Das Ergebnis bestätigt, dass sich das durch mAk 2c erkannte gB-Epitop beider Virustypen strukturell nicht unterscheidet.

Tab. 13: Funktionelle Affinitäten des murinen mAk 2c sowie generierter 2c-Antikörperfragmente.

	HSV-1 F				HSV-2 G
	<i>bivalent</i>		<i>monovalent</i>		<i>bivalent</i>
	mAk 2c	2c-F(ab') ₂	2c-Fab	2c-scFv	mAk 2c
K _D [nM]	10	7	17	19	10

3.2.3. Neutralisationseffizienz bivalenter und monovalenter Antikörper *in vitro*

Die Neutralisationseffizienz des mAk 2c und dessen Derivate 2c-F(ab')₂ und 2c-Fab gegenüber HSV-1 und HSV-2 wurde im Mikrotitrationsverfahren nach der Endverdünnungsmethode untersucht (2.2.4.14). Zum quantitativen Vergleich wurde dabei die Antikörper- bzw. Antikörperfragment-Konzentration bestimmt, die zur vollständigen Neutralisation einer definierten Virusmenge von 100 TCID₅₀ erforderlich ist.

Die Ergebnisse der Neutralisationsuntersuchungen zeigten, dass die bivalenten Antikörper mAk 2c und 2c-(Fab')₂ HSV-1 mit einer vierfach höheren Effizienz neutralisierten als HSV-2 (Abb. 24). Zur vollständigen Neutralisation von HSV-1 war eine Konzentration von 8 nM mAk 2c bzw. 4 nM 2c-(Fab')₂ erforderlich. Um die gleiche Viruslast von HSV-2 vollständig neutralisieren zu können, war eine Konzentration von 31 nM des mAk 2c bzw. 16 nM des 2c-(Fab')₂ notwendig. Überraschender Weise zeigte das monovalente 2c-Fab-Fragment im Vergleich zu den bivalenten Antikörpern eine drastisch reduzierte Neutralisationseffizienz. Eine vollständige Neutralisation von HSV-1 bzw. HSV-2 durch das 2c-Fab-Fragment wurde erst bei einer Konzentration von 3000 nM erreicht. Die eingesetzte Konzentration des monovalenten Antikörper-Fragmentes lag somit im Vergleich zum parentalen mAk 2c um den Faktor 375 (HSV-1) bzw. 94 (HSV-2) deutlich höher. Parallel dazu wurde das ebenfalls monovalente 2c-scFv-Fragment hinsichtlich seiner neutralisierenden Eigenschaften untersucht. Die eingesetzte Konzentration von 3000 nM konnte zwar das Entstehen von Plaques geringfügig reduzieren, jedoch das Virus nicht vollständig neutralisieren.

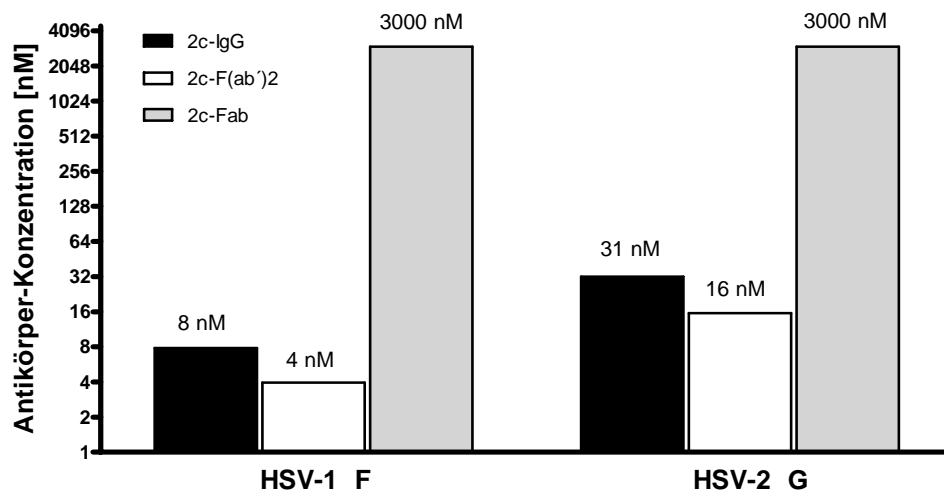


Abb. 24: *In vitro* Neutralisation von HSV-1 bzw. HSV-2. Eine Viruslast von 100 TCID₅₀ HSV-1 bzw. HSV-2 wurde jeweils mit abgestuften Konzentrationen der bivalenten Antikörper mAk 2c-IgG und 2c-F(ab')₂ oder des monovalenten 2c-Fab für 1 h zur Reaktion gebracht und anschließend auf Vero-Zellen für 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturen hinsichtlich des Auftretens eines zytopathischen Effektes (CPE) lichtmikroskopisch überprüft. Dargestellt ist jeweils die Antikörpermenge, die zur vollständigen Unterdrückung der Ausbildung eines CPE (100 % Neutralisation) in der Lage war.

Obwohl mAk 2c und 2c-F(ab')₂ keinen Unterschied in der funktionellen Affinität gegenüber beiden HSV-Subtypen zeigten (3.2.2.), jedoch HSV-1 vierfach effizienter neutralisierten als HSV-2, wurde die Anzahl der Virusgenome einer HSV-1 und HSV-2 Probe mit einer jeweils definierten Anzahl an infektiösen Viruspartikeln (1×10^4 TCID₅₀/ml) mittels quantitativer Real-Time-PCR (2.2.1.2) bestimmt. Die Quantifizierung der Virusgenome zeigte, dass in der HSV-2 Probe die 4,9-fache Menge an Virusgenomen im Vergleich zu der HSV-1 Probe vorlag (Tab. 14). Die Anzahl der Virusgenome zwischen der HSV-1 und der HSV-2 Probe unterscheidet sich um denselben Faktor wie jeweils die zur vollständigen Virusneutralisation benötigte Antikörperkonzentration. Folglich lässt sich der Unterschied in der Neutralisationseffizienz des mAk 2c gegenüber beiden HSV-Subtypen auf eine höhere Anzahl an Viruspartikeln in der untersuchten HSV-2 Probe zurückführen. Aufgrund der Bindung an die bei HSV-2 vermehrt vorhandenen nichtinfektiösen Virionen musste mAk 2c in einer entsprechend höheren Konzentration eingesetzt werden, um die gleiche neutralisierende Wirkung zu erzielen wie bei HSV-1 (Tab. 14).

Tab. 14: Quantifizierung der Virusgenome von HSV-1 bzw. HSV-2 mittels quantitativer RT-PCR.

	Anzahl der Virusgenome einer Virusprobe von 1×10^4 TCID ₅₀ /ml	Zur vollständigen Neutralisation einer Viruslast von 100 TCID ₅₀ benötigte Konzentration von mAk 2c / [nM]
HSV-1 F	24550	8
HSV-2 G	119000	31
Verhältnis HSV-1 / HSV-2	1 : 4,85	1 : 4

Das Ergebnis der durchgeführten Neutralisationsexperimente und die unterschiedliche funktionelle Affinität der untersuchten Antikörper lassen einen Zusammenhang zwischen der Antikörpervaleanz und der Neutralisationseffizienz vermuten. Daher wurde die neutralisierende Wirkung monovalenter 2c-Fab-Fragmente nach Kreuzvernetzung durch einen gegenüber murinen Fab-Fragmenten reaktiven, nicht-neutralisierenden polyklonalen Antikörper untersucht. Die kreuzvernetzten 2c-Fab-Fragmente zeigten im Vergleich zu den nativen 2c-Fab-Fragmenten eine um den Faktor 2 deutlich gesteigerte Neutralisationseffizienz (Abb. 25). Das antivirale Potential des mAk 2c konnte durch die Kreuzvernetzung allerdings nicht vollständig wiederhergestellt werden.

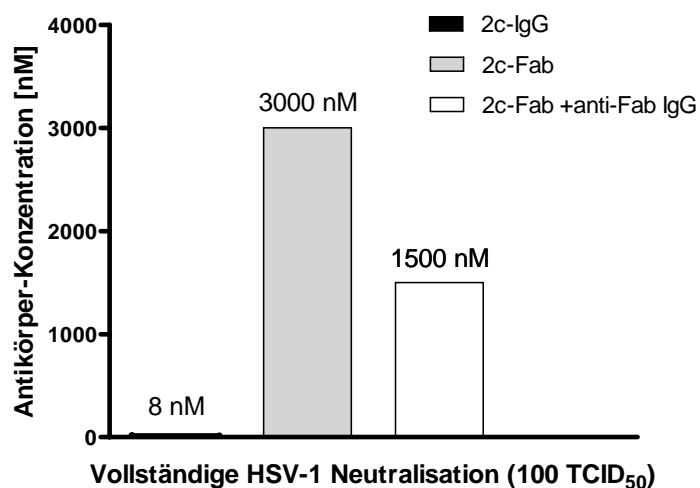


Abb. 25: Neutralisationseffizienz kreuzvernetzter 2c-Fab-Fragmente. Monovalente 2c-Fab-Fragmente wurden mit und ohne Zusatz eines kreuzvernetzenden, Fab-spezifischen Ziege-anti-Maus Antikörpers mit 100 TCID₅₀ HSV-1 zur Reaktion gebracht. Als Kontrolle wurde der bivalente mAk 2c eingesetzt.

3.2.4. Untersuchung des Neutralisationsmechanismus von mAk 2c

Antikörper können durch Bindung an virale Oberflächenantigene die Adsorption von Viren an die Zielzellen inhibieren und diese dadurch erfolgreich neutralisieren. Zur Untersuchung der Wirkungsweise des mAk 2c wurde die zur vollständigen Virusneutralisation erforderliche Antikörperkonzentration bei einer Applikation entweder vor („preattachment“) bzw. nach („postattachment“) erfolgter Virus-Adsorption an Zielzellen bestimmt. Die Experimente sollten Aufschluss darüber geben, ob die Adsorption freier Viren an die Wirtszelle durch die Bindung des mAk 2c an gB gehemmt wird. Als Kontrolle wurde das polyklonale humane Immunglobulin-Präparat Intratect® eingesetzt.

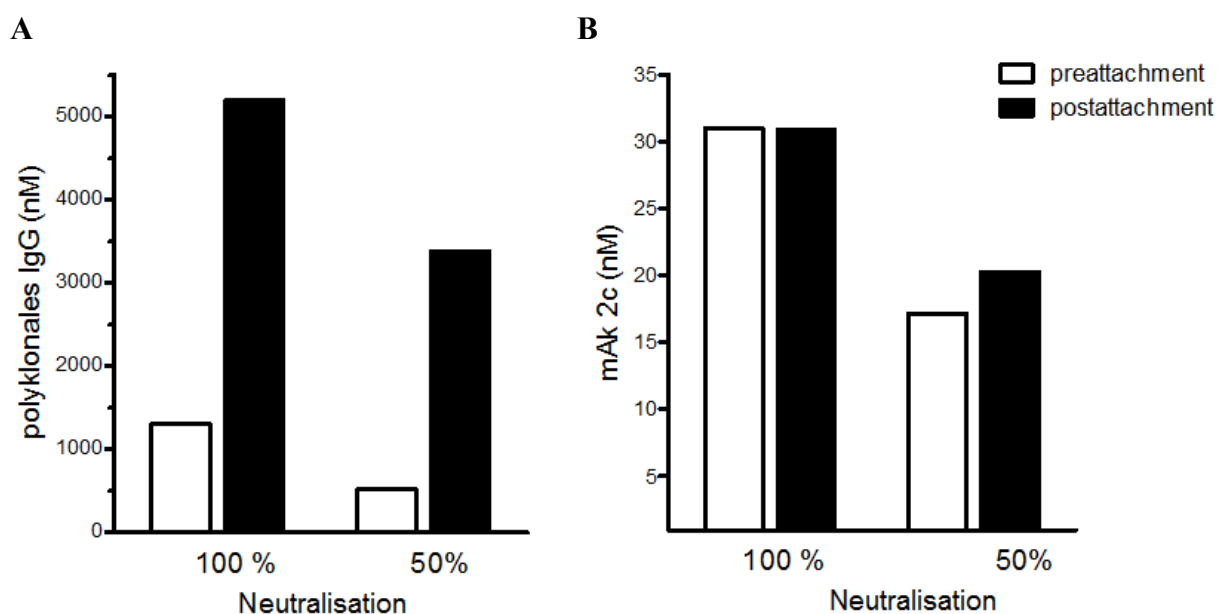


Abb. 26: Vergleich des Neutralisationsverhaltens von mAk 2c und polyklonalen humanen IgG. Abgestufte Konzentrationen des mAk 2c (**A**) oder des polyklonalen IgGs (**B**) wurden entweder nach Präinkubation mit einer Viruslast von 100 TCID₅₀ HSV-1 F („preattachment“, weiße Balken) oder nach einer bereits erfolgten Adsorption der Viren an Zielzellen („postattachment“, schwarze Balken) in Mikrotitrationsplatten auf Vero-Zellen für die Dauer von 72 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturen hinsichtlich des Auftretens eines zytopathischen Effektes (CPE) lichtmikroskopisch überprüft und die zur 100 %-igen und 50 %-igen Virusneutralisation erforderlichen Antikörpertiter bestimmt.

Polyklonales humanes IgG zeigte einen deutlichen Unterschied im Neutralisationsverhalten gegenüber freien HSV-1 Virionen und bereits an die Wirtszellen adsorbierten Viren. Nach bereits erfolgter Virus-Adsorption war eine um den Faktor 5 höhere Konzentration des polyklonalen IgG zur vollständigen bzw. 50 %-igen Neutralisation erforderlich (Abb. 26A). Im Gegensatz dazu wies mAk 2c eine gleichermaßen effiziente Virus-Neutralisation auf unabhängig davon, ob HSV-1 als freie Viruspartikel oder in einem gebundenen Zustand nach Adsorption an die Zielzellen vorlag (Abb. 26B). Dies deutet darauf hin, dass die Wirkungsweise des mAk 2c primär nicht auf der Inhibition des Adsorptions-Vorgangs basiert.

3.2.5. Inhibition des „cell-to-cell spreads“ durch mAk 2c und dessen Derivate

Die Fähigkeit der gB-spezifischen Antikörper zur Inhibition der direkten Virus-Ausbreitung von einer infizierten Zelle zur nichtinfizierten Nachbarzelle („cell-to-cell spread“) wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Damit eine indirekte HSV-Ausbreitung über den Zellkulturüberstand infolge einer Freisetzung von Viren aus infizierten Zellen unterbunden wird und sich das Virus nur durch den „cell-to-cell spread“ Mechanismus ausbreiten kann, wurden HSV-1 F infizierte Vero-Zellen mit einem Vielfachen der für die vollständige Virus-Neutralisation erforderlichen Antikörpermenge inkubiert. Nach 48 h wurden HSV-infizierte Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Ziege-anti-HSV Serums detektiert (2.2.3.3).

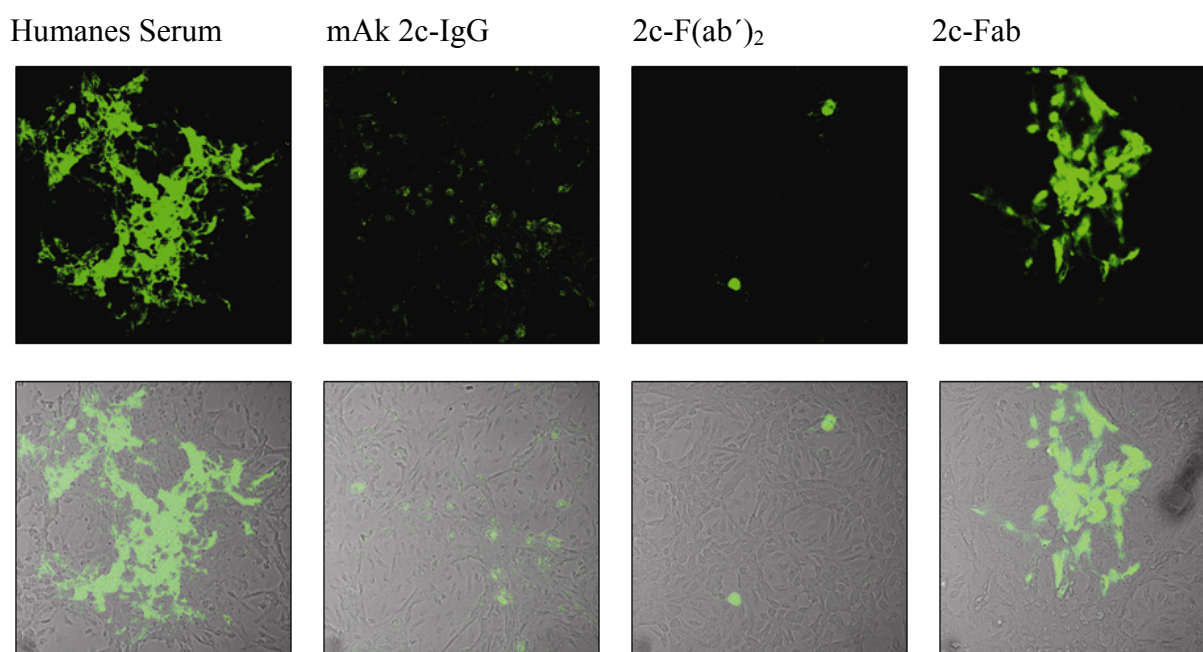


Abb. 27: Inhibition der direkten HSV-1 Ausbreitung von Zelle zu Zelle durch gB-spezifischen Antikörper. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (obere Reihe) und deren Überlagerung mit lichtmikroskopischen Aufnahmen (untere Reihe) zeigen konfluente Vero-Zellen 48 Stunden nach Infektion. Vier Stunden nach Infektion mit HSV-1 F (400 TCID₅₀) wurde das virushaltige Inokulationsmedium entfernt und die Zellen mit antikörperhaltigem (mAk 2c-IgG (500 nM); 2c-F(ab')₂ (500 nM) oder 2c-Fab (3000 nM)) Medium überschichtet. Polyklonales humanes anti-HSV-Serum wurde in einer 1:20 Verdünnung eingesetzt (Überschusskonzentration). Infizierte Vero-Zellen wurden nach 48 Stunden durch Immunfärbung mit einem FITC-konjugierten, polyklonalen Ziege-anti-HSV Serum detektiert.

Entsprechend den Ergebnissen der Neutralisationstests spielte die Antikörpervalenz auch hinsichtlich der Inhibition der direkten Virus-Ausbreitung über den „cell-to-cell spread“ Mechanismus eine Schlüsselrolle. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung zeigte, dass die direkte Virus-Ausbreitung durch die bivalenten Antikörper mAk 2c-IgG und 2c-F(ab')₂ vollständig unterbunden und auf die primär infizierte einzelne Zelle beschränkt blieb

(Abb. 27). Das monovalente 2c-Fab-Fragment zeigte bei einer Konzentration von 3000 nM zwar eine leicht Plaque-reduzierende Wirkung, war jedoch zu einer vollständigen Inhibition des „cell-to-cell spread“ nicht in der Lage (Abb. 27). Das polyklonale humane anti-HSV-Serum zeigte dagegen keine Plaque-reduzierende Wirkung.

3.3. Chimärisierung und Humanisierung des murinen Antikörpers mAk 2c

Zur späteren immuntherapeutischen Anwendung des mAk 2c im Menschen wurden auf Grundlage des murinen Antikörpers ein chimärer und ein humanisierter Antikörper im IgG-Format hergestellt. Hierzu wurden zunächst die Gene der variablen schweren und leichten Kette (V_H , V_L) des mAk 2c mittels 5'-RACE („Rapid Amplification of cDNA Ends“-)PCR (2.2.1.4) aus der Myelomhybrid-Zelllinie 2c amplifiziert und die authentischen Gensequenzen mittels Sequenzierung bestimmt. Durch Klonierung der V_H - und V_L -Gensequenzen in die von unserem Kooperationspartner Herrn Dr. Grosse-Hovest (Universität Tübingen) entwickelten Expressionsplasmide, welche bereits die humanen konstanten Gensegmente der leichten Kette bzw. schweren Kette des IgG1-Isotyps enthielten, wurde der chimäre Antikörper mAk ch2c generiert. Zur Herstellung des humanisierten Antikörpers wurden die für die sechs Antigenbindungsschleifen („Complementarity Determining Regions“, CDRs) kodierenden Genabschnitte des mAk 2c ($2cV_L$ -CDR1/2/3 und $2cV_H$ -CDR1/2/3) in jeweils geeignete humane „Framework“-Immunglobulin-Akzeptorgerüste aus der menschlichen Keimbahn genetisch „transplantiert“ („CDR-grafting“). Zur Identifizierung geeigneter humaner Keimbahn-Akzeptorgerüste wurden die murinen mAk 2c FR-Sequenzen mit korrespondierenden humanen FR-Sequenzen (V-, D- und J-Gene der schweren Kette; V-, und J-Gene der leichten Kette) aus der Gendatenbank V-Base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) auf Aminosäure-Ebene abgeglichen. Als Akzeptorsequenz für die CDRs von V_H wurde DP28 mit einer Sequenzidentität von 88,5% und als Akzeptorsequenz für die CDRs von V_L DPK13 mit einer Sequenzidentität von 88,9 % ausgewählt. Durch computergestützte Transplantation der entsprechenden murinen CDRs der V_H - bzw. V_L -Kette von mAk 2c in diese beiden humanen Akzeptorgerüste konnten humanisierte V_H - und V_L -Hybridgene generiert werden. Bei der Humanisierung monoklonaler Antikörper ist es notwendig, diejenigen Aminosäuren im Bereich der humanen Framework-Regionen zu identifizieren, die die strukturelle Integrität der transplantierten murinen CDRs unterstützen und dadurch auch die Antigenbindungseigenschaften des Antikörpers beeinflussen. Sind diese kritischen Positionen mit zur murinen Sequenz inkompatiblen Aminosäuren besetzt, kann sich dies negativ auf die Antigenbindungseigenschaften des humanisierten Antikörpers auswirken und macht eine

Rückmutation dieser Aminosäuren zur murinen Donorsequenz notwendig. Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Andrew C.R. Martin (University College London, UK) wurde von Dr. Jürgen Krauss eine Methode entwickelt, die es erlaubt, potentiell kritische Aminosäuren mit Hilfe von Antikörper-Repertoire-Datenbanken zu identifizieren und in einem zweiten Schritt die jeweils kritische Signifikanz auf der Basis von Referenz-Antikörpern mit bekannter dreidimensionaler Struktur zu untersuchen (123). Durch Anwendung dieses Verfahrens konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch für die Humanisierung des mAk 2c mehrere als potenziell kritisch einzustufende Aminosäuren (AS) im Bereich der humanen V_H- und V_L-Framework-Regionen identifiziert werden. Infolge dessen wurden vier humanisierte mAk 2c-Varianten (mAk hu2c V1-V4) mit sukzessiven Framework-Rückmutationen zur jeweiligen murinen AS-Donorsequenz hergestellt (Tab. 15).

Tab. 15: Humanisierte mAk 2c-Varianten mit Framework-Rückmutationen

Humanisierte mAk Variante	2c CDR-Grafting		Rückmutationen zur murinen 2c FR-Donorsequenz	
	V _L	V _H	V _L	V _H
hu2c V1	CDR1/2/3	CDR1/2/3	-	-
hu2c V2	CDR1/2/3	CDR1/2/3	-	N76K
hu2c V3	CDR1/2/3	CDR1/2/3	-	N76K, V79F
hu2c V4	CDR1/2/3	CDR1/2/3	I2V	N76K, V79F

Die Synthese der computertechnisch generierten V_H- und V_L-DNA-Sequenzen und die anschließende Klonierung in den Zwischenklonierungs-Vektor pCR4-TOPO (Invitrogen) erfolgte im Auftrag durch die Firma Entelechon (Regensburg). Zur Optimierung der Expression in Säugerzellen wurden die Sequenzen auf Nukleotid-Ebene durch Codon-Optimierung an das eukaryotische Translationssystem *Mus musculus* angepasst. Das Einfügen der sukzessiven Rückmutationen an kritischen Positionen erfolgte entweder durch die Firma Entelechon oder durch Amplifikation der V_H- und V_L-Gene mit Hilfe von geeigneten Primern. Ein Sequenzabgleich der murinen V_H- und V_L-Donorsequenzen mit den für die Humanisierung des mAk 2c ausgewählten humanen Akzeptorsequenzen ist in Abb. 28 dargestellt.

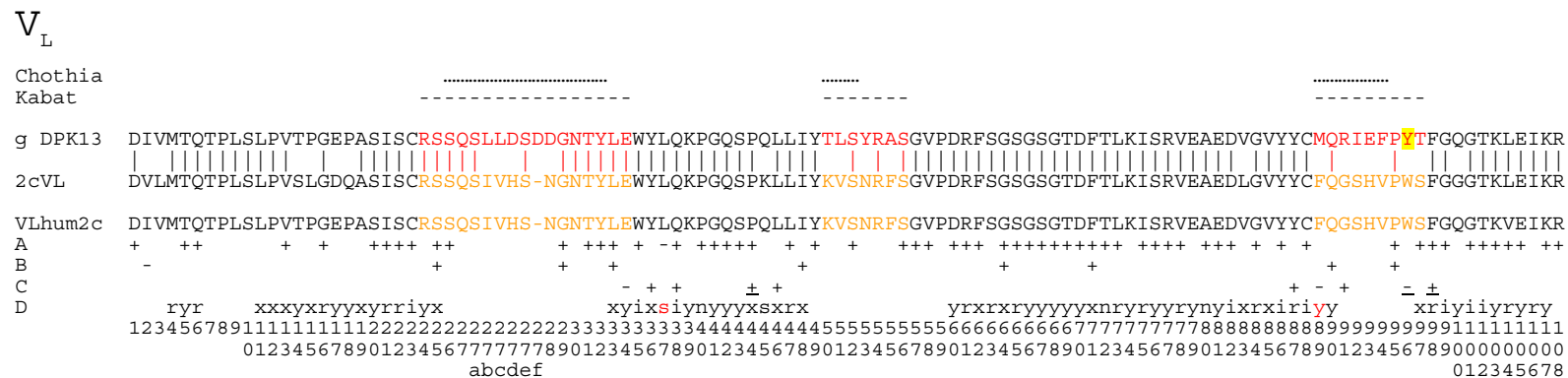


Abb. 28: Sequenzabgleich der schweren und leichten Kette (V_H und V_L). Die Definition der hypervariablen Regionen erfolgte nach Chothia *et al* (38) (gepunktete Linie) und Kabat *et al.* (106) (gestrichelte Linie). Humane Keimbahnsequenzen DP28 und DPK13 wurden nach Sequenzabgleich aus der Datenbank V-Base (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) entnommen und dienten als Akzeptorsequenzen für die CDRs des murinen 2c mAk. (A) „invariant residues“ (106), (B) „key residues“ (38), (C) Aminosäuren die im V_H/V_L -Interface liegen (39). Markierung (+) für Übereinstimmung bzw. (-) für Nicht-Übereinstimmung zwischen der humanen und murinen Sequenz. (D) Aminosäuren in der „core site“ definiert nach Chothia *et al.* (36): konstanter (i) Rest; vergleichbarer (r) Rest; zur Oberfläche hin gewandte (s) Reste R, K, E, D, Q, N; neutrale (n) Reste P, H, Y, G, A, S, T; verdeckte (b) Reste C, V, L, I, M, F, W; Desweiteren x für verdeckte (b) oder neutrale (n) Reste, y für Reste an der Oberfläche (s) oder neutrale Reste (n). Rot markiert sind Reste, die sich in ihrer Spezifikation zwischen der murinen und humanen Sequenz unterscheiden. Die Nummerierung der Aminosäuren erfolgte nach Kabat *et al.* (106).

3.3.1. Produktion und Aufreinigung von mAk ch2c und hu2c V1-V4

Zur Herstellung des chimärisierten Antikörpers (mAk ch2c) und der humanisierten Varianten (mAk hu2c V1-V4) wurden die synthetisierten und gentechnisch modifizierten V_H- und V_L-Gene in von unserem Kooperationspartner Dr. Grosse-Hovest (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellte IgG1-Expressionsplasmide kloniert. Zur eukaryontischen Expression dieser Antikörper wurden murine Sp2/0 Myelom-Zelllinien stabil mit den Expressionsplasmiden transfiziert. Einzelklone mit quantitativer Antikörperproduktion wurden mittels ELISA-Verfahren selektioniert (2.2.3.2) und zur weiteren Kultivierung ausgewählt. Die quantitative Produktion und Aufreinigung von mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4 erfolgte analog zu dem für den parentalen mAk 2c ausführlich beschriebenen Verfahren (2.2.2.3). Die Überprüfung der Antikörperpräparationen mittels SDS-Gelelektrophorese und analytischer Gelfiltration unter Verwendung einer Superdex 200 10/300 GL Säule zeigten eine zum mAk 2c vergleichbare Reinheit von über 95%. Die aus einem Volumen von 1 L Zellkultur-Überstand gewonnenen Antikörpermengen der entsprechenden Klone sind in (Tab. 16) zusammengefasst.

Tab. 16: Ausbeute der aufgereinigten rekombinanten Antikörper aus 1 Liter Zellkulturüberstand.

	Chimäre	Humanisierte Varianten			
	ch2c	hu2c V1	hu2c V2	hu2c V3	hu2c V4
Antikörpermenge (mg/l)	0,8	2,8	1,6	4,0	1,6

3.4. Funktionelle *in vitro* Charakterisierung der rekombinanten Antikörper

3.4.1. Bestimmung der funktionellen Affinität von mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4

Zunächst wurde überprüft, ob durch die Chimärisierung bzw. Humanisierung die Antigenbindungseigenschaften des parentalen Antikörpers beibehalten werden konnten. Hierzu wurde die funktionelle Affinität von mAk ch2c und den mAks hu2c V1-V4 durch durchflusszytometrische Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten (K_D) auf HSV-1 infizierten Vero-Zellen ermittelt (Abb. 29). Der chimäre Antikörper mAk ch2c zeigte eine dem parentalen murinen Antikörper vergleichbare Affinität. Überraschenderweise konnte bei der Humanisierung bereits durch die alleinige CDR-Transplantation bei mAk hu2c V1 eine dem murinen mAk 2c vergleichbare funktionelle Affinität erreicht werden (Abb. 29). Die sukzessiven Rückmutationen in die humanen Framework-Regionen zur murinen Donor-

Sequenz verbesserten die Antigenbindungsaffinitäten der Varianten V2-V4 nicht wesentlich. Im Fall von mAk hu2c V2 führte die Rückmutation N76K in der schweren Kette sogar zu einer 50%-igen Reduktion der funktionellen Affinität (Abb. 29). Die mittleren Affinitätskonstanten von mehreren unabhängigen Messungen sind in Tab. 17 dargestellt.

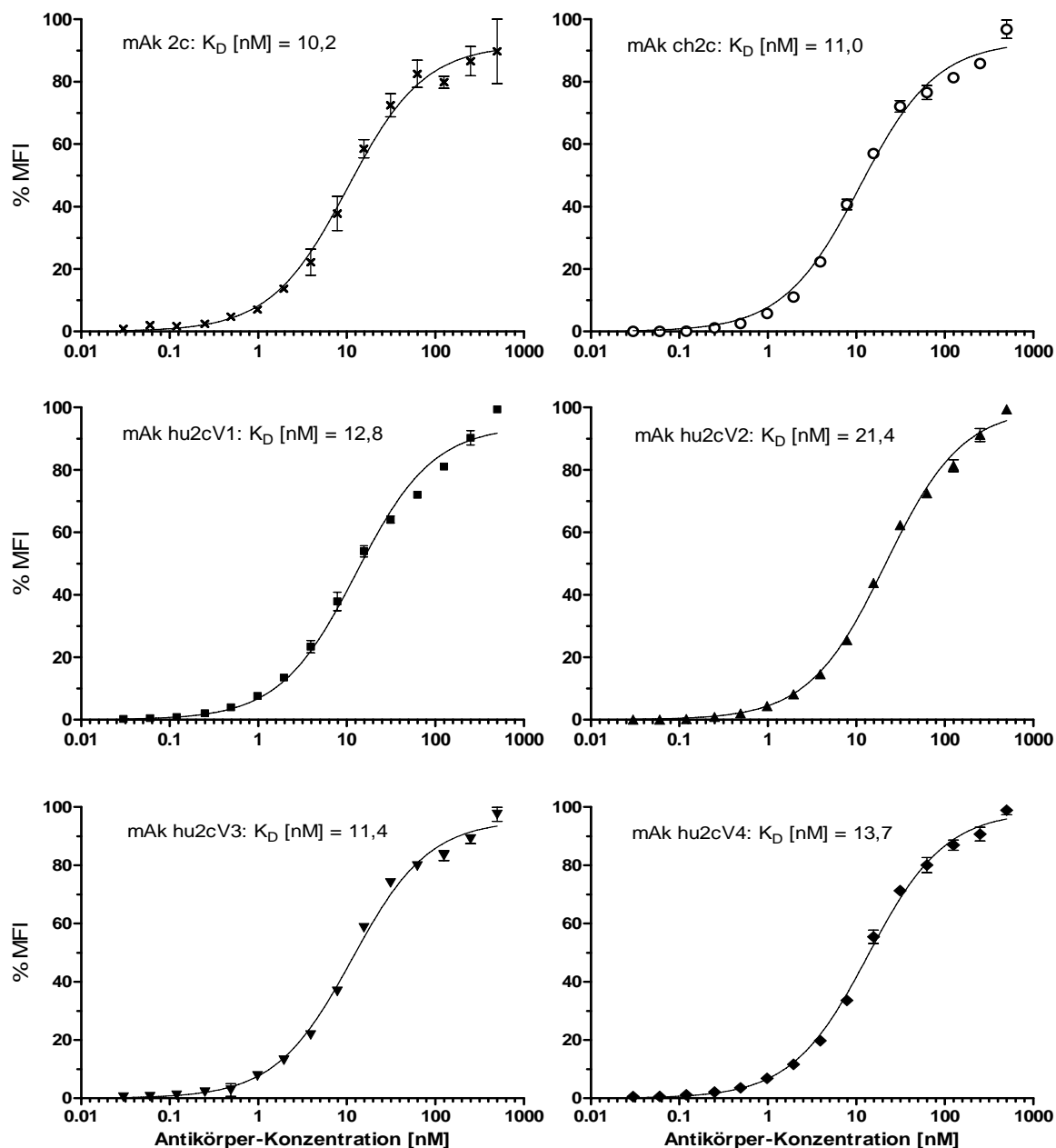


Abb. 29: Bestimmung der funktionellen Affinität rekombinant hergestellter Antikörper. Infizierte Vero-Zellen (3 MOI HSV-1 F) wurden 16 h nach Infektion mit abgestuften Antikörperkonzentrationen des chimärisierten mAk ch2c und der humanisierten Varianten mAk hu2c V1-V4 inkubiert und durchflusszytometrisch nach Inkubation mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper analysiert. Die Gleichgewichtskonstanten K_D wurden nach der Marquardt-Levenberg Methode mit dem Programm Prism 5 errechnet. MFI = Mediane Fluoreszenzintensität.

Tab. 17: Mittlere Affinitätskonstanten (K_D) der Antikörper mAk 2c, mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4

	2c	ch2c	hu2c V1	hu2c V2	hu2c V3	hu2c V4
K_D [nM]	10	10,6	12,5	20,5	11,5	13,6

3.4.2. Kompetitionsstudien

Zur Überprüfung, ob die gentechnisch generierten Antikörper das gleiche Epitop wie der parentale mAk 2c erkennen, wurden Kompetitionsstudien durchgeführt. Die Durchführung erfolgte unter zwei verschiedenen experimentellen Bedingungen (2.2.3.7). Im Ansatz A dienten der chimäre Antikörper mAk ch2c bzw. eine der humanisierten Varianten mAk hu2c V1-V4 als Kompetitoren für den parentalen Antikörper mAk 2c (Abb. 30A). Im Ansatz B dagegen wurde mAk 2c als Kompetitor für die rekombinanten Antikörper verwendet (Abb. 30B). In beiden Fällen wurden HSV-1 F infizierte Vero-Zellen zunächst mit ansteigenden Kompetitor-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden mAk 2c (Ansatz A) und die rekombinanten Antikörper (Ansatz B) jeweils mit einer konstanten Konzentration von 100 nM hinzugegeben. Die spezifische Antigen-Bindung von mAk 2c (Ansatz A) sowie der rekombinanten Antikörper (Ansatz B) wurde jeweils mit Hilfe eines entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörpers detektiert.

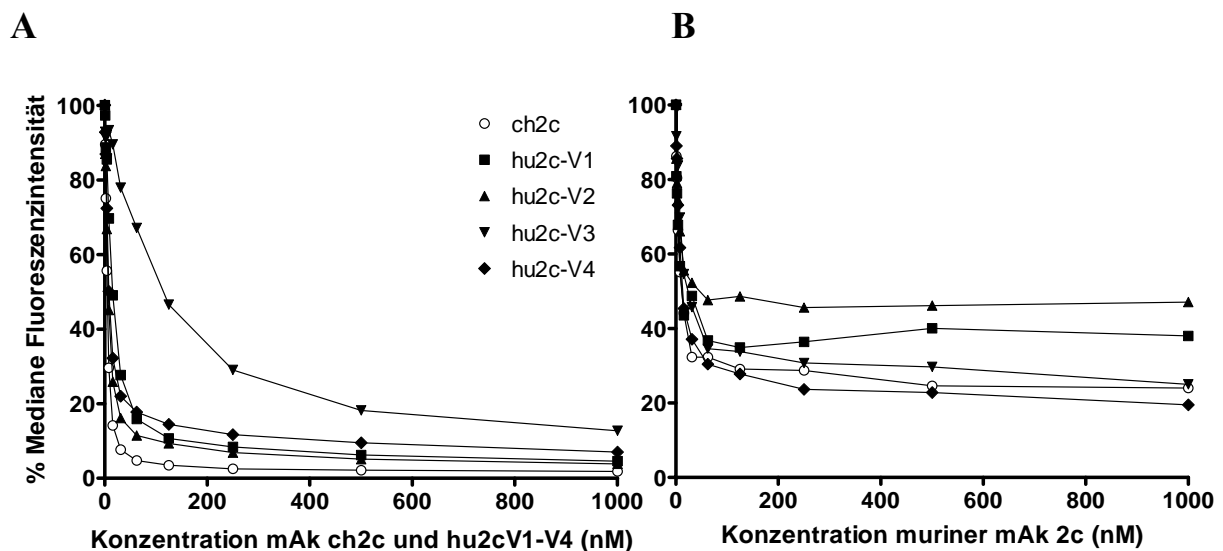


Abb. 30: Kompetitionsstudien zur Untersuchung der spezifischen Antigenbindung der gentechnisch hergestellten Antikörper mAk ch2c bzw. mAk hu2c V1-V4. Infizierte Vero-Zellen (3 MOI HSV-1 F) wurden mit abgestuften Antikörper-Konzentrationen der als Kompetitor fungierenden Antikörper mAk ch2c, mAk hu2c V1-V4 (**A**) oder mAk 2c (**B**) vorinkubiert. Die hinsichtlich der Epitopspezifität zu untersuchenden Antikörper mAk 2c (**A**) bzw. mAk ch2c, mAk hu2c V1-V4 (**B**) wurden anschließend mit einer Konzentration von 100 nM appliziert und nach Anfärbung durch FITC-konjugierte Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Maus-Fc (**A**) oder Ziege-anti-Mensch-Fc γ (**B**) durchflusszytometrisch auf Antigenbindung untersucht.

Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl der chimäre als auch die humanisierten Antikörper mit dem parentalen Antikörper mAk 2c um die Antigenbindungsstelle konkurrieren. Die Bindung des kompetierten Antikörpers nahm mit einer ansteigenden Kompetitor-Konzentration entsprechend ab. Im Ansatz A blockierten die rekombinanten Antikörper die Bindung des parentalen mAk 2c nahezu vollständig (Abb. 30A). Im Ansatz B jedoch wurde trotz des 10-fachen Überschusses des mAk 2c die Bindung der rekombinanten Antikörper nur bis zu 60-80% inhibiert (Abb. 30B). Dieser beobachtete Effekt lässt sich am wahrscheinlichsten durch die Bindung der IgG-Fc-Domänen des chimärisierten bzw. der humanisierten Antikörper an den viralen HSV-Fc-Rezeptor (gE/gI-Komplex), der im Zuge der Virusreplikation auf die Zelloberfläche infizierter Zellen exprimiert wird, erklären. Die Interaktion zwischen der IgG-Fc-Domäne und dem HSV-Fc-Rezeptor ist Spezies-spezifisch. Im Gegensatz zu murinen Antikörpern können Antikörper mit einer humanen IgG-Fc-Domäne eine Bindung mit HSV-Fc-Rezeptoren eingehen. Dies erklärt, weshalb die Bindung des mAk 2c im Ansatz A vollständig durch die rekombinanten Antikörper kompetiert werden konnte, während im Ansatz B der mAk 2c nicht zur gänzlichen Inhibition der Bindung der rekombinanten Antikörper in der Lage war.

3.4.3. Antivirale Aktivität von mAk ch2c und der humanisierten Varianten *in vitro*

Die Neutralisationsfähigkeit von mAk ch2c und den humanisierten Varianten hu2c V1-V4 gegenüber HSV-1 F wurde analog zum mAk 2c im Mikrotitrationsverfahren untersucht (2.2.4.14). Die zur vollständigen Virusneutralisation benötigten Antikörperkonzentrationen sind vergleichend mit dem parentalen Antikörper mAk 2c in Abbildung 31 dargestellt.

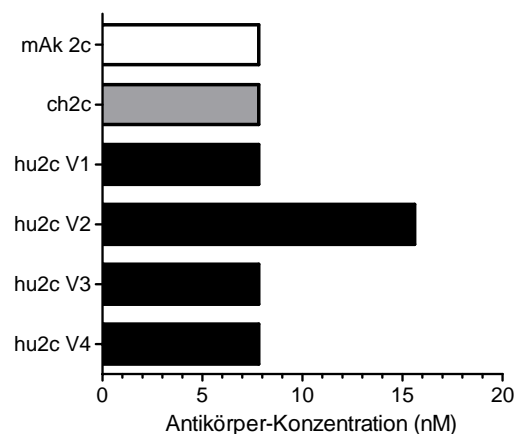


Abb. 31: Neutralisationseffizienz der rekombinant hergestellten HSV-spezifischen Antikörper. Abgestufte Konzentrationen von mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4 wurden jeweils mit 100 TCID₅₀ HSV-1 F für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend zu konfluenten Vero-Zellen hinzugegeben. Nach 72 h wurde die Ausbildung zytopathischer Effekte lichtmikroskopisch untersucht und die zur vollständigen Virus-Neutralisation benötigten Antikörperkonzentrationen ermittelt.

Der chimärisierte Antikörper ch2c und die humanisierten Antikörpervarianten mAk hu2c V1-V4 mit Ausnahme der Variante mAk hu2c V2 neutralisierten das Herpesvirus mit gleicher Effizienz wie der parentale Antikörper mAk 2c. Bei der humanisierten Variante mAk hu2cV2 ist eine Korrelation der verminderten Neutralisationseffizienz und der erniedrigten funktionellen Affinität (Tab. 17) auffällig.

3.4.4. Biophysikalischen Stabilität von mAk 2c, mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4

Neben den funktionellen Eigenschaften ist Die Stabilität eines Antikörpers für dessen therapeutischen Einsatz im Mensch essentiell. Zur Bestimmung der biophysikalischen Stabilität wurden die aufgereinigten Antikörper bis zu 30 Tage in einem physiologischen Kochsalzpuffer (10mg/ml BSA) bei 37°C inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten wurden Antikörperproben entnommen und das Antigenbindungsverhalten an HSV-1 F infizierten Vero-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Der unter diesen Bedingungen gemessene Verlauf der Bindungsaktivität erlaubte die Bestimmung der biophysikalischen Stabilität unter funktionellem Gesichtspunkt. Der direkte Vergleich der rekombinanten Antikörper mAk ch2c und hu2c V1-V4 mit dem parentalen Antikörper zeigte, dass mit Ausnahme von mAk hu2c V4 alle gentechnisch generierten Antikörper die Bindungsaktivität über einen Zeitraum von einem Monat nahezu unverändert beibehalten (Abb. 32).

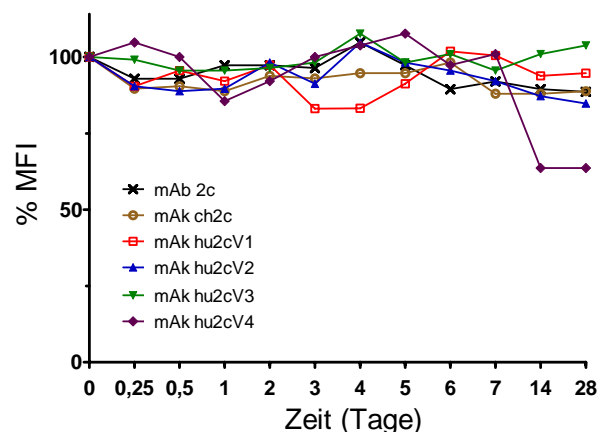


Abb. 32: Untersuchung der biophysikalischen Stabilität. Die Bindungsaktivität der Antikörper wurde zu definierten Zeitpunkten durchflusszytometrisch bestimmt und in prozentualer Relation zu der am Tag 0 entnommenen Probe gesetzt. MFI = Mediane Fluoreszenzintensität.

Zur weiteren präklinischen Charakterisierung wurde die humanisierte Variante mAk hu2c V1 ausgewählt, da dieser rekombinante Antikörper eine dem parentalen mAk 2c vergleichbare Affinität und Neutralisationseffizienz aufweist, und im Unterschied zu den Varianten hu2cV2-V4 keine potentiell immunogenen Rückmutationen zur murinen Donorsequenz in den „Framework“-Regionen enthält.

3.4.5. Inhibition des „cell-to-cell spreads“ durch mAk ch2c und mAk hu2c V1

Die Fähigkeit von mAk ch2c und mAk hu2c V1 zur Inhibition der HSV-spezifischen direkten Ausbreitung von einer infizierten Zelle zur nichtinfizierten Nachbarzelle wurde entsprechend der unter 3.2.5 beschriebenen Vorgehensweise untersucht. Als Referenz wurde der parentale mAk 2c eingesetzt (Abb. 33).

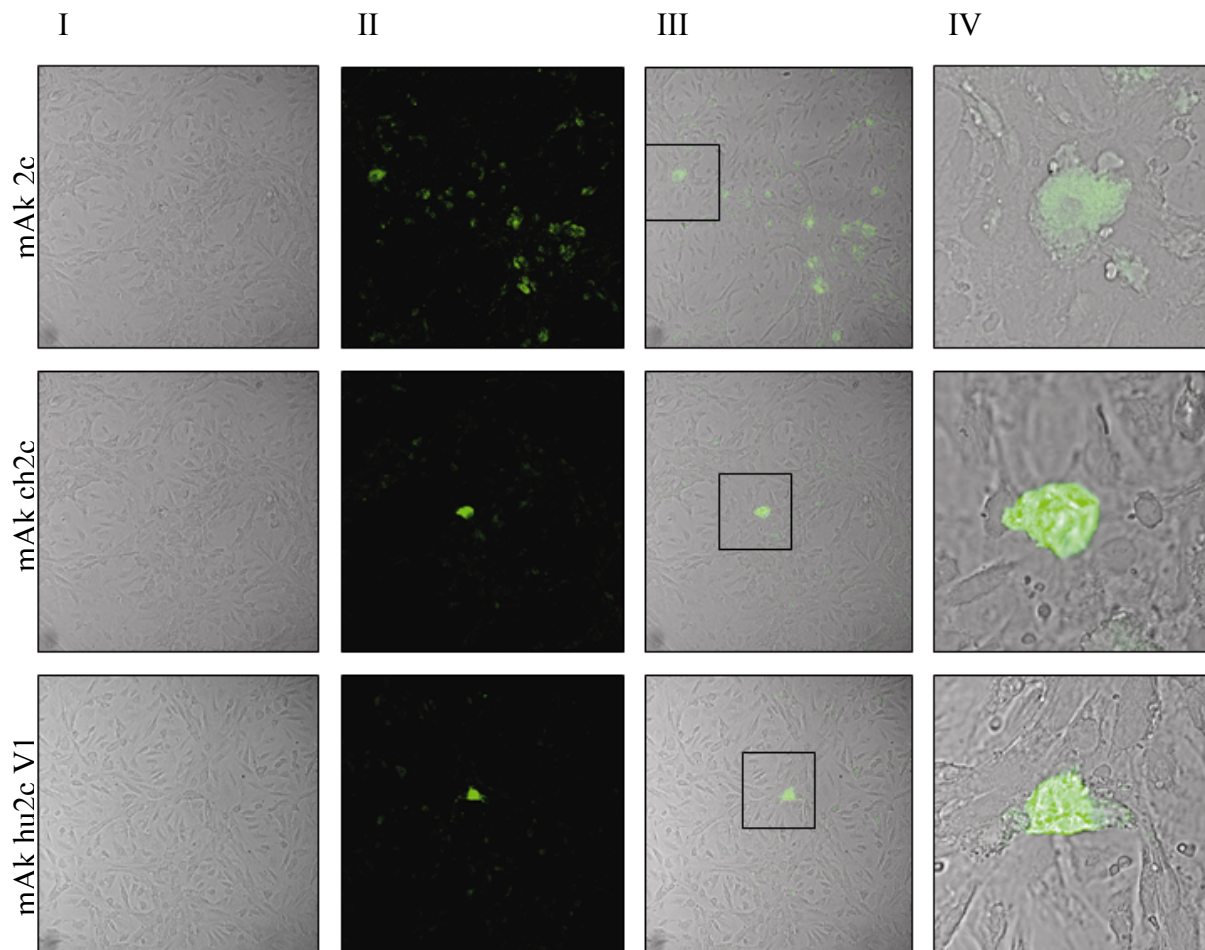


Abb. 33: Inhibition der direkten Virus-Ausbreitung von Zelle zu Zelle durch mAk ch2c und hu2c V1. Zur Infektion wurden auf Glasobjektträgern konfluent gewachsene Vero-Zellen mit einer niedrigen Viruslast von 400 TCID₅₀ HSV-1 F über 4 Stunden inkubiert. Nach Entfernung des Inokulationsmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und jeweils mit einer Überschusskonzentration von 500 nM der Antikörper mAk 2c, mAk ch2c oder mAk hu2c V1 in Zellkulturmedium überschichtet. **(I)** Phasenkontrastaufnahme; **(II)** Anfärbung HSV-infizierter Zellen mit einem FITC-markierten, polyklonalen Ziege-anti-HSV-Serum (grün); **(III)** Überlagerung der Aufnahmen I&II; **(IV)** Ausschnittsvergrößerung der in Reihe III markierten Einzelzellen. Alle Aufnahmen erfolgten mit dem Leica DM IRE2 konfokalen Mikroskop bei einer 40-fachen Vergrößerung.

Die Untersuchungen zeigten, dass der chimärisierte Antikörper ch2c und der humanisierte Antikörper hu2c V1 die direkte Virus-Ausbreitung von Zelle zu Zelle mit der gleichen Effektivität inhibierten wie der parentale mAk 2c. Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden durch einen unabhängigen konventionellen Plaque-Inhibitionstest (93) bestätigt (Daten nicht gezeigt).

3.4.6. Untersuchung der Fähigkeit zur Komplementaktivierung des hu2c V1

Humane Antikörper können, im Gegensatz zu murinen Antikörpern, über ihre Fc-Domäne durch den HSV-Fc-Rezeptorkomplex gE/gI gebunden werden. Dadurch wird die Bindung des C1q-Proteins an die IgG-Fc-Domäne inhibiert und eine Komplement-vermittelte Zytotoxizität unterdrückt. Die Wirksamkeit von komplementabhängigen Antikörpern wird dadurch signifikant reduziert. Die HSV-1 F Δ gE –Deletionsmutante (53) besitzt eine Deletion im Bereich des gE-Gens und ist somit im Gegensatz zu der korrespondierenden Revertante HSV-1 F rev nicht zur Expression eines funktionsfähigen HSV-Fc-Rezeptors in der Lage. Durch direkten Vergleich der Neutralisationseffizienz des mAk hu2c V1 und des parentalen mAk 2c gegenüber HSV-1 F Δ gE bzw. der Revertante mit und ohne Zusatz von Komplement konnte die Wirksamkeit der Antikörper in Abhängigkeit von der Komplementaktivierung untersucht werden. Als Kontrolle wurde das polyklonale humane IgG-Präparat Cytotect® (Biotest Pharma GmbH) eingesetzt, welches sich durch einen hohen Anteil an HSV-spezifischen Antikörpern auszeichnet. Die Versuche wurden in Kooperation mit Prof. Hartmut Hengel (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt.

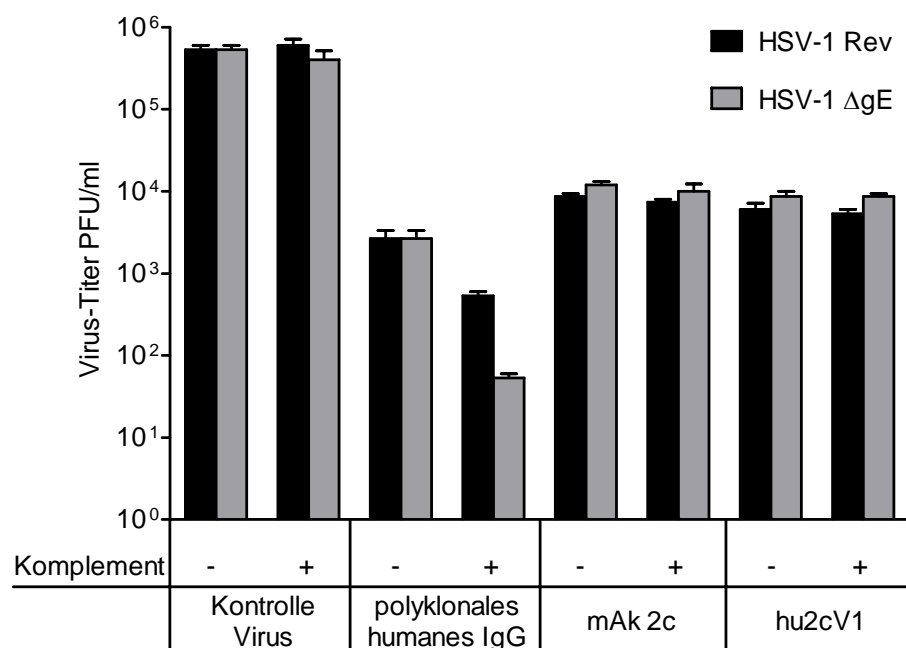


Abb. 34: Untersuchung der Komplementabhängigkeit von mAk 2c und mAk hu2c V1. Eine definierte Virusmenge von 5×10^5 PFU der Virusstämme HSV-1 F Δ gE bzw. HSV-1 F rev wurde mit jeweils 1 μ g mAk 2c oder mAk hu2c V1 bei 37°C für 90 min inkubiert. Als Kontrolle wurde Cytotect® mit einer Endkonzentration von 120 μ g/ml eingesetzt. Die Antikörper-Virus Gemische wurden anschließend zu konfluenten Vero-Zellen hinzugegeben. Der resultierende Virustiter wurde 48 h nach Infektion durch Auszählung von Plaques unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Der Versuch wurde mit (+) und ohne (-) Zugabe von Komplement (IgG-depletiertes Anti-HSV-negatives Spenderserum) durchgeführt.

Die untersuchten Antikörper mAk 2c und mAk hu2c V1 zeigten keinen komplementabhängigen Unterschied in der Neutralisationseffizienz gegenüber den beiden eingesetzten Virusstämmen (Abb. 34). Folglich sind beide Antikörper zu einer vollständig von Komplement-unabhängigen Virusneutralisation in der Lage. Das polyklonale IgG-Präparat Cytotect® zeigte dagegen wie erwartet einen komplementabhängigen antiviralen Effekt. Das Komplement verstärkte den antiviralen Effekt von Cytotect® gegenüber beiden Virusstämmen mit unterschiedlichem Ausmaß. Die HSV-1 F Δ gE-Deletionsmutante konnte nach Zugabe von Komplement 10-fach besser durch das polyklonale IgG neutralisiert werden als die Revertante (Abb. 34). Da bei Abwesenheit von Komplement kein Unterschied in der Neutralisationseffizienz von Cytotect® gegenüber HSV-1 F Δ gE bzw. HSV-1 F Rev messbar war lässt sich schlussfolgern, dass die Wirksamkeit von HSV-neutralisierenden humanen Antikörpern abhängig von der Komplementaktivierung ist.

3.4.7. Untersuchung der Inhibition der mAk 2c- bzw. mAk hu2c V1 vermittelten Effektorzell-Aktivierung durch den HSV-gE/gI-Komplex

Die Interaktion des HSV-gE/gI-Komplexes mit der Fc-Domäne humaner, Virus-neutralisierender IgGs blockiert nicht nur die Aktivierung von Komplement, sondern auch die Aktivierung von Immun-Effektorzellen und führt dadurch zu einer weiteren Abschwächung einer antiviralen Antikörper-Immunantwort bei einer HSV-Infektion. Die Auswirkung dieser Interaktion auf eine Effektorzell-Aktivierung durch mAk 2c und mAk hu2c V1 wurde mit Hilfe eines zellulären BW5147-Reporterassays in Kooperation mit Prof. Hartmut Hengel (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) untersucht. Die murine T-Zell-Thymoma-Zelllinie BW5147, welche nach antigener Stimulation Interleukin 2 (IL-2) sezerniert, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Hengel mit Plasmiden zu membranständigen Expression der extrazellulären Domänen der humanen Fc γ -Rezeptoren Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32A), Fc γ RIIb (CD32B), Fc γ RIII (CD16) und des murinen Fc γ -Rezeptors mCD16 stabil transfiziert (Abb. 35). Durch Bindung der IgG-Fc-Domäne an die Fc γ -Rezeptoren der BW5147-Transfektanten wird die Sekretion von IL-2 induziert, welches anschließend im ELISA-Test quantifiziert werden kann. Mit Hilfe dieses artifiziellen Reporter-Systems kann eine mögliche Immunaktivierung von NK-Zellen und anderen Effektorzellen (Tab. 2) *in vitro* nachgeahmt werden.

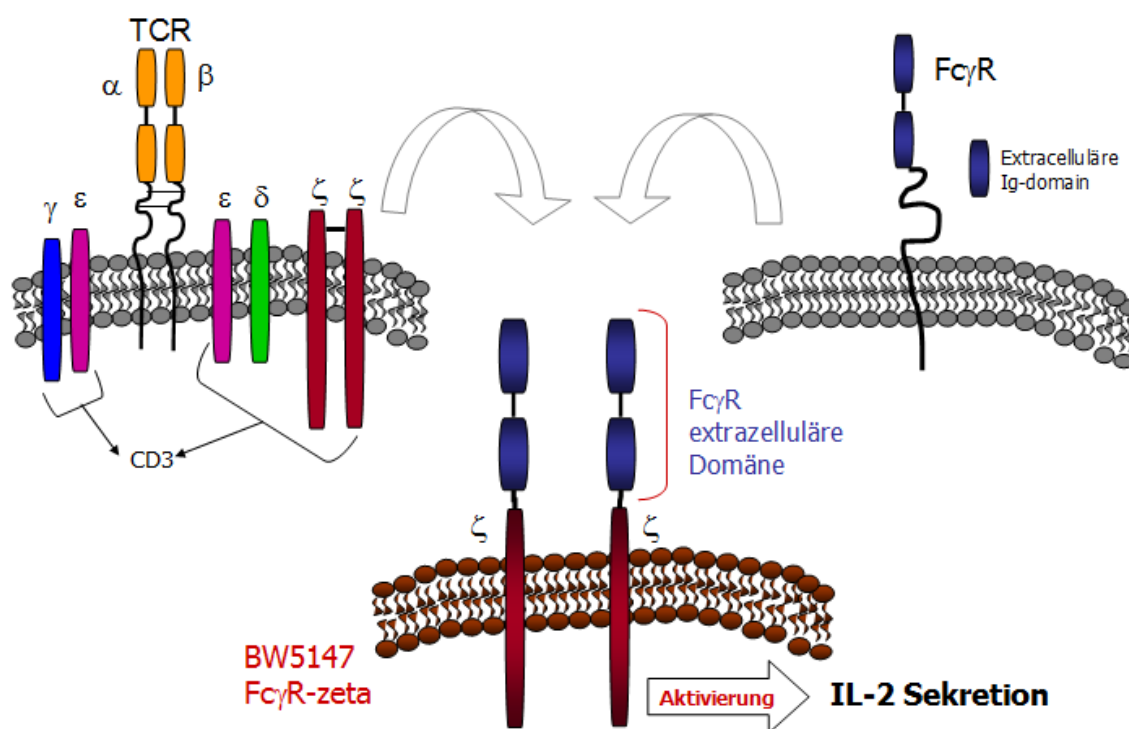


Abb. 35: BW5147-Reportersystem. BW5147-Zellen wurden mit dem FcγR-TCRζ-Hybridgen, bestehend aus der extrazellulären Domäne eines Fcγ-Rezeptors (human: CD16, CD32A, CD32B oder CD64; murin: CD16) und der Zeta-Domäne des T-Zell-Rezeptors (TCRζ), stabil transfiziert.

Zur Untersuchung der Funktionalität der generierten BW5147-Reporter-Zellen wurden diese zunächst mit Fcγ-Rezeptor-spezifischen Antikörpern stimuliert und die Menge an produziertem IL-2 als Maß für die maximale Aktivierung im ELISA-Test quantifiziert (Tab. 18). Die untersuchten Transfektanten konnten wie erwartet durch die entsprechenden Antikörper spezifisch stimuliert werden.

Tab. 18: Aktivierung von BW5147-Reporterzellen. Mikrotiterplatten wurden mit Antikörpern gegen den murinen Fcγ-Rezeptor mCD16 bzw. einen der humanen Fcγ-Rezeptoren beschichtet und für 24 h mit der entsprechenden BW5147-Reporter-Zelllinie inkubiert. Die Quantifizierung der IL-2 Produktion erfolgte mittels ELISA. Angegeben ist die gemessene Adsorption bei 450 nm.

Stimulation IL-2-Prod. Transfektante	PBS-Kontrolle	Anti-CD16/ Anti- mCD16	Anti-CD32	Anti-CD64
Naiv	0,027	0,028	0,027	0,019
FcγRIII (CD16)	0,036	1,815	0,038	0,035
FcγRII (CD32A)	0,038	0,077	1,638	0,083
FcγRIIb (CD32B)	0,037	0,034	1,291	0,029
FcγRI (CD64)	0,09	0,059	0,071	1,641
mCD16	0,052	0,567	xxx	xxx

Zur Untersuchung einer potentiellen Inhibition der antikörpervermittelten Effektorzell-Aktivierung durch den gE/gI-Komplex wurden Vero-Zellen mit entweder HSV-1 F Δ gE oder HSV-1 F rev infiziert (jeweils 2 MOI) und nach 24 Stunden mit ansteigenden mAk 2c- bzw. mAk hu2c V1 Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden die antikörperbehandelten Vero-Zellen mit transfizierten BW5147-Reporter-Zellen für 24 Stunden co-kultiviert, um die Reporterzell-Aktivierung über Antikörper, die virale Antigene infizierter Vero-Zellen gebunden haben, zu untersuchen. Die IL-2 Produktion der Reporterzellen wurde anschließend ebenfalls mittels ELISA quantifiziert (2.2.4.18). Zum Vergleich der ermittelten Werte wurde die in Tab. 18 gelistete maximale Aktivierung der BW5147-Reporterzellen mit 100% gleichgesetzt. Als Kontrollen wurden das polyklonale IgG-Präparat Cytotect[®] und der humanisierte anti-RSV-Antikörper Synagis eingesetzt. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente sind in Abb. 36 dargestellt.

Das polyklonale IgG-Präparat Cytotect[®] induzierte bei allen untersuchten BW5147-Reporter-Zelllinien IL-2-Produktion und bestätigte dadurch deren Aktivierbarkeit durch Antikörper (Abb. 36 A, C, E, G). Der humanisierte Antikörper mAk hu2c V1 war zur Aktivierung der Fc γ -Rezeptoren CD16 und CD64 (Abb. 36 B, H) aber nicht zur Aktivierung der Fc γ -Rezeptoren CD32A und CD32B in der Lage (Abb. 36 D, F). Wie erwartet wurden die entsprechenden Reporter-Zellen sowohl durch Cytotect[®] als auch durch mAk hu2c V1 bei einer Infektion mit HSV-1 F Δ gE stärker aktiviert als bei einer HSV-1 F rev Infektion mit intaktem HSV-Fc-Rezeptorkomplex gE/gI. Eine Ausnahme stellte die Aktivierung des CD64-Rezeptors dar. Überraschenderweise konnte dieser bei einer vorliegenden Infektion mit HSV-1 F rev stärker aktiviert werden als im Falle einer Infektion mit der Deletionsmutante HSV-1 F Δ gE. Das Vorhandensein eines funktionellen HSV-gE/gI-Komplexes scheint in diesem Reportersystem eine Aktivierung des CD64-Rezeptors zu induzieren. Diese Beobachtung ist im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht worden, wird jedoch zurzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Hartmut Hengel weiter erforscht. Unabhängig von einer HSV-1 F Δ gE bzw. HSV-1 F rev Infektion wurden die mCD16-Fc γ -Rezeptor-Transfektanten durch mAk 2c gleich stark aktiviert (Abb. 36 I). Dieses Ergebnis bestätigt, dass murine Antikörper im Gegensatz zu humanen Antikörpern nicht durch den herpesviralen HSV-Fc-Rezeptorkomplex gebunden werden. Inwieweit sich die Inhibition der mAk hu2c V1-vermittelten Aktivierung des CD16-Fc γ -Rezeptors durch den HSV-Fc-Rezeptor (Abb. 36 B) auf die Neutralisationseffizienz dieses Antikörpers auswirkt sollte im Tiermodell untersucht werden.

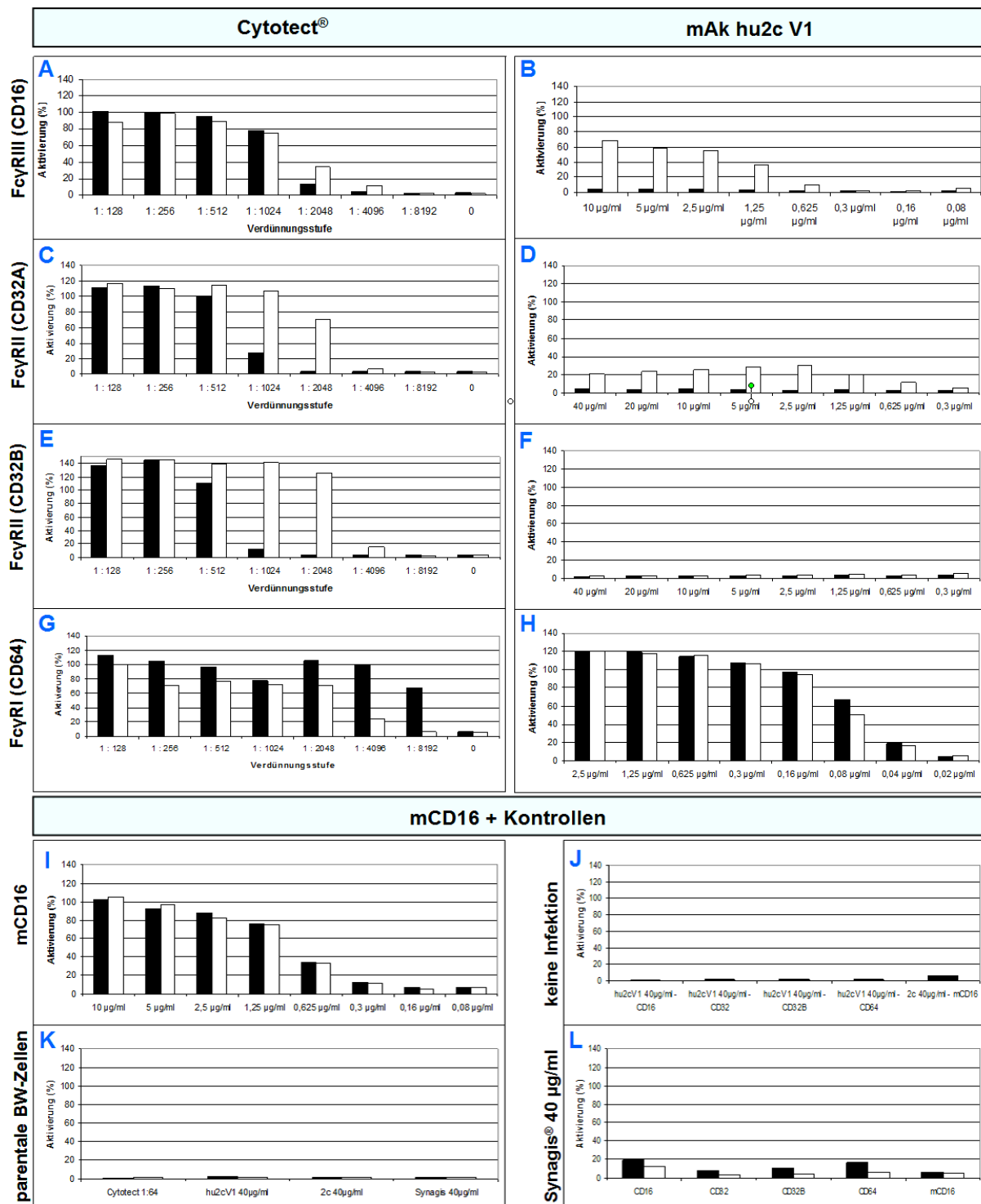


Abb. 36: Aktivierung von Fcγ-Rezeptoren durch mAk 2c bzw. mAk hu2c V1. Konfluente Vero-Zellen wurden mit 2 MOI HSV-1 F ΔgE (weiße Balken) oder HSV-1 F rev (schwarze Balken) infiziert. Nach 24 h wurde das Inokulationsmedium verworfen und die Zellen mit abgestuften Antikörper-Konzentrationen für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Co-Inkubation der infizierten und Antikörperbehandelten Vero-Zellen mit den jeweiligen BW5147-Reporterzellen für die Dauer von 24 h wurden die Zellen permeabilisiert und die IL-2-Produktion im ELISA quantifiziert. Der humanisierte Antikörper hu2c V1 wurde hinsichtlich der Aktivierung der CD16-(B), CD32- (D), CD32B(F)- und CD64-Rezeptoren (H) untersucht. Zur Kontrolle der Funktionsweise der BW5147-Effektorzelllinien wurde Cytotect® eingesetzt (A), (C), (E), (G). Der murine mAk 2c wurde im Hinblick auf die Aktivierung des mCD16-Rezeptore untersucht (I). Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörper mAk 2c und mAk hu2c V1 wurden nicht infizierte Vero-Zellen verwendet (J). Parentale, nicht-transfizierte BW5147-Zellen dienten zur Überprüfung der Spezifität membranständigen Fcγ-Rezeptoren der Reporterzellen (K). Als Kontrollantikörper wurde der RSV-spezifische humanisierte Antikörper Synagis eingesetzt (L). Die Messung der Adsorption erfolgte bei einer Wellenlänge 450 nm. Infektion von Vero-Zellen durch: ■ = HSV-1 F rev; □ = HSV-1 F ΔgE

3.5. Neutralisation klinisch isolierter HSV-Stämme durch mAk hu2c V1

Die Fähigkeit des mAk hu2c V1 zur Virus-Neutralisation wurde in der vorliegenden Arbeit bisher nur an dem Laborstamm HSV-1 F demonstriert. Zur weitergehenden präklinischen Untersuchung sollte die antivirale Wirksamkeit des mAk hu2c V1 gegenüber einem breiten Spektrum klinisch isolierter Virusstämme sowie an weiteren Laborstämmen getestet werden. Hierzu wurden zunächst von 20 Patientenproben (Abstrich, Rachenspülwasser oder Bronchiallavage) mit nicht näher untersuchter Virustatika-Resistenz Virusstocks generiert. Die Genotypisierung (HSV-1/HSV-2) der generierten Virusstocks wurde in Kooperation mit Prof. Eis-Hübinger (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn) mittels PCR durchgeführt. Von den 20 untersuchten Patientenproben wurden 14 als HSV-1 genotypisiert und sechs als HSV-negativ getestet (Tab. 19). Bei einem der HSV-negativen Isolate konnte das humane Adenovirus Typ 5 mittels PCR nachgewiesen werden. Alle HSV-negativen Proben wurden verworfen. Der Virustiter der HSV-positiven Virusstocks wurde im Mikrotitrationsverfahren bestimmt und die zur 100%-igen Neutralisation einer Virusmenge von 100 TCID₅₀ erforderliche mAk hu2c V1-Konzentration im Neutralisationstest ermittelt.

Tab. 19: Herstellung und Neutralisation von Virus-Stocks aus klinischen Patientenproben.

Probe Nr.	Differenzierung HSV-1/HSV-2	Titer TCID ₅₀ /ml	Zur 100%-Neutralisation von 100 TCID ₅₀ benötigte mAk hu2c V1-Konzentration [nM]
1	negativ	---	---
2	1	7,9 x 10 ⁵	7,8
3	1	1,3 x 10 ⁶	4,0
4	negativ	---	---
5	1	3,2 x 10 ⁶	7,8
6	1	1,6 x 10 ⁵	7,8
7	1	5 x 10 ⁷	7,8
8	1	7,9 x 10 ⁷	7,8
9	1	7,9 x 10 ⁶	7,8
10	Adenovirus Typ 5	---	---
11	negativ	---	---
12	1	6,3 x 10 ⁶	7,8
13	1	1,3 x 10 ⁷	7,8
14	1	1,3 x 10 ⁶	7,8
15	negativ	---	---
16	1	1 x 10 ⁷	7,8
17	1	1,3 x 10 ⁸	7,8
18	1	2 x 10 ⁶	7,8
19	1	1,3 x 10 ⁷	15,6
20	negativ	---	---

Desweiteren wurden von Prof. Thomas Mertens (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Ulm) Virusisolate aus Patientenproben mit einer experimentell nachgewiesenen verminderten Sensitivität gegenüber den Virustatika Aciclovir (ACV), Foscarnet (PFA) und Cidofovir (CDV) zur Verfügung gestellt. Die Virustatika-Sensitivität Virusstocks wurde in Ulm durch Bestimmung der zur 50%-igen Virusneutralisation (HD50) benötigten Virustatika-Konzentration von ACV, PFA und CDV ermittelt und diese als sensitiv, vermindert-sensitiv bzw. resistent klassifiziert (Tab. 20).

Tab. 20: Virustatika-Sensitivität von HSV-Isolaten. Bestimmt wurde diejenige Virustatika-Dosis, bei der 50 % Neutralisation auftritt (HD50).

Medikamenten-Sensitivität	HD50 (µM)		
	ACV (Aciclovir)	PFA (Foscarnet)	CDV (Cidofovir)
sensitiv	bis 4,00	bis 300	bis 10,00
vermindert sensitiv	4,01 - 13,00	301-400	10,01-15,00
resistent	> 13,01	> 400	> 15,01

Alle zur Verfügung gestellten Isolate zeichneten sich durch eine Resistenz bzw. verminderte Sensitivität gegenüber ACV aus. Das Isolat R13 wies eine Resistenz gegenüber ACV und PFA auf. Besonders auffällig war das Isolat R10, welches zusätzlich zu Resistenzen gegenüber ACV und PFA eine verminderte Sensitivität gegenüber CDV aufwies.

Tab. 21: Herstellung und Neutralisation von klinischen Virusisolaten mit nachgewiesener Virustatika-Resistenz. Orange = resistent; Gelb = vermindert sensitiv; Grün = sensitiv.

Nummer	HSV-Typ	Titer TCID ₅₀ /ml	HD50 (µM) ACV	HD50 (µM) PFA	HD50 (µM) CDV	Zur 100%-Neutralisation von 100 TCID ₅₀ benötigte mAk hu2c V1-Konz. [nM]
R1	?	xxx	3,8	1091,8	5,5	xxx
R2	1	2,5 x 10 ⁶	48,5	103,3	2,2	4,0
R3	2	xxx	5,2	36,1	5,1	xxx
R4	1	1,6 x 10 ⁷	41,3	92,3	2,6	4,0
R5	2	7,9 x 10 ⁵	65,0	54,2	7,8	31,3
R6	2	7,9 x 10 ³	43,8	57,7	8,2	62,5
R7	1	1 x 10 ⁷	104,7	112,2	2,9	7,8
R8	1	4 x 10 ⁶	36,2	48,2	0,8	7,8
R9	1	8 x 10 ⁶	14,6	78,2	0,7	7,8
R10	1	2 x 10 ⁵	52,5	954,4	14,4	7,8
R11	1	3,2 x 10 ⁵	4,3	363,8	3,1	4,0
R12	1	2 x 10 ⁴	6,4	341,9	2,3	4,0
R13	1	5 x 10 ⁶	35,7	522,3	7,8	7,8
R14	2	6,3 x 10 ⁴	66,3	65,1	5,2	31,3

Von den klinischen Isolaten aus Ulm wurden nach Herstellung von Virusstocks ebenfalls der Virustiter bestimmt und eine Subtyp-Differenzierung vorgenommen. Von zwölf der 14 zur Verfügung gestellten Proben konnten Virusstocks generiert werden, wovon neun als HSV-1 und drei als HSV-2 identifiziert wurden.

Die Neutralisationseffizienz von mAk hu2c V1 gegenüber den generierten Virusstämmen wurde entsprechend im Neutralisationstest ermittelt (Tab. 21). Abb. 37 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Neutralisationstests von mAk hu2c V1 gegenüber den Isolaten mit unbekannter (Tab. 19) bzw. mit nachgewiesener Virustatika-Resistenz (Tab. 21) sowie gegenüber verschiedenen Laborstämmen. Zusätzlich zu dem bereits eingesetzten Laborstamm HSV-1 F wurden die Standard-Laborstämme HSV-2 G (50) und HSV-1 17 syn⁺ (23) sowie ein hochvirulenter HSV-1 Stamm (HSV-1 342 hv (60)) und der HSV-1 TK⁻ Stamm mit Mutation im Thymidinkinase-Gen (68) untersucht.

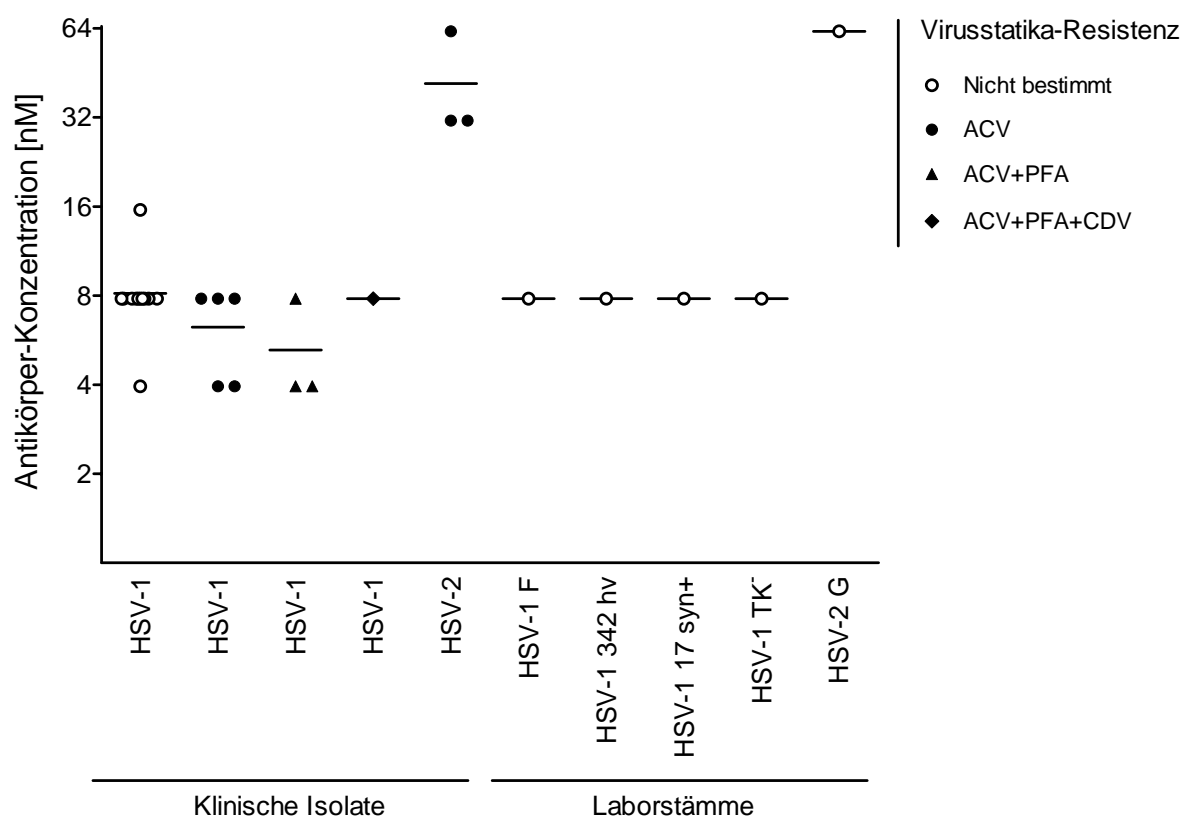


Abb. 37: Neutralisation von klinischen HSV-Isolaten und Laborstämmen durch hu2c V1. Eine definierte Virusmenge von 100 TCID₅₀ des angegebenen Virusstamms bzw. klinischen Isolates wurde mit unterschiedlichen mAk hu2c V1-Konzentrationen inkubiert und die Antikörperkonzentration die zur vollständigen Virus-Neutralisation führt im Mikrotitrationsverfahren ermittelt.

Alle untersuchten Isolate und Laborstämme konnten durch den mAk hu2c V1 vollständig neutralisiert werden. Hierbei wurden sowohl Isolate mit nachgewiesener Virustatika-

Resistenz als auch Isolate ohne untersuchte Resistenz sowie die Laborstämme mit gleicher Effizienz durch mAk hu2c V1 neutralisiert. Wie auch schon bei der Neutralisation der Laborstämme HSV-1 F und HSV-2 G durch den murinen mAk 2c gezeigt werden konnte (3.2.3), war zur Neutralisation klinischer HSV-2 Isolate eine 4-fach höhere Antikörperkonzentration (mAk hu2c V1) erforderlich. Zur Neutralisation klinischer HSV-1 Isolate und der Laborstämme HSV-1 F, HSV-1 17 syn⁺ und HSV-1 TK⁻ war eine mAk hu2c V1-Konzentration im Bereich von 4-16 nM erforderlich. HSV-2 Isolate und der Laborstamm HSV-2 G konnten erst bei einer Konzentration von 31-63 nM mAk hu2c V1 vollständig neutralisiert werden.

3.6. Funktionelle Charakterisierung von mAk 2c und mAk hu2c V1 *in vivo*

Publizierte Untersuchungen im Mausmodell von unserem Kooperationspartner Prof. Eishübing (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn) zeigten, dass die Gabe des parentalen mAk 2c sowohl bei immunkompetenten als auch T-Zell-depletierten (CD4⁻/CD8⁻) Versuchstieren zu einer Eindämmung der HSV-Infektion führt (60, 61). Zur Untersuchung, ob mAk 2c und der humanisierte Antikörper mAk hu2c V1 *in vivo* völlig unabhängig von einer zellulären Immunantwort eine HSV-Infektion verhindern bzw. eliminieren kann, wurde in dieser Arbeit ein NOD/SCID-Mausmodell verwendet (1.2.6). NOD/SCID-Mäuse zeichnen sich durch eine multiple Immunsuppression aus, da sie keine reifen B- und T-Zellen und auch keine NK-Zellen und Makrophagen besitzen. Desweiteren verfügen NOD/SCID-Mäuse nicht über ein funktionsfähiges Komplementsystem (132, 183).

3.6.1. Etablierung eines HSV-NOD/SCID-Mausmodells

3.6.1.1. Bestimmung der zur Infektion benötigten Virusdosis

Zur Infektion der NOD/SCID-Mäuse mit HSV-1 wurde der im Rahmen publizierter Arbeiten bereits für immunkompetente Mäuse etablierte intravaginale Infektionsweg gewählt (61, 69, 161). Die Mäuse im Alter von 4-6 Wochen wurden in Gruppen von jeweils drei Versuchstieren mit verschiedenen Laborstämmen mit zwei unterschiedlichen Virusmengen intravaginal infiziert (Abb. 38). Der Infektionsverlauf wurde bis zum Auftreten einer akuten Symptomatik einer HSV-Infektion (Lähmung der Hinterbeine, Enzephalitis) über einen Zeitraum von 30 Tagen protokolliert.

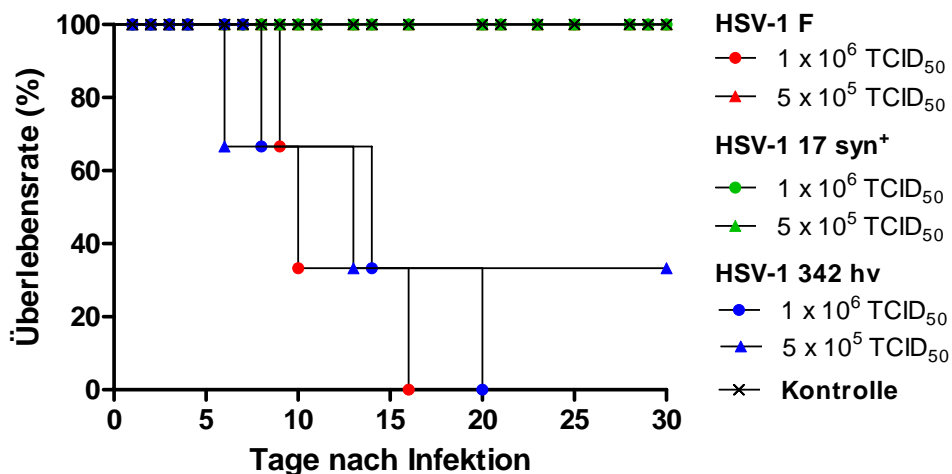


Abb. 38: Etablierung des HSV-NOD/SCID-Mausmodells. Versuchstiere im Alter von 4-6 Wochen wurden mit einer Viruslast von entweder 1×10^6 - (Kreise) oder 5×10^5 TCID₅₀ (Dreiecke) infiziert. Zur Infektion wurden die Laborstämme HSV-1 F (rot), HSV-1 17 syn⁺ (grün) oder HSV-1 342 hv (blau) eingesetzt. Kontrolle = nichtinfizierte Versuchstiere.

Überraschenderweise konnte mit dem Laborstamm HSV-1 17 syn⁺ unabhängig von der Virusmenge keine HSV-Infektion induziert werden. Die Infektion der Versuchstiere mit einer Virusmenge von 1×10^6 TCID₅₀ der beiden Laborstämme HSV-1 F und HSV-1 342 hv führte bei Allen Tieren der jeweiligen Gruppe zu einer letal verlaufenden HSV-Infektion. Die Versuchstiere mussten aufgrund schwerwiegender Symptomatik (Läsionen an der Vaginalschleimhaut, Lähmungen der Hinterbeine, Gewichtsverlust) an Tagen 9, 10 und 16 (HSV-1 F) bzw. 8, 14 und 20 (HSV-1 342 hv) getötet werden. Auffällig war, dass die HSV-1 F infizierten Tiere innerhalb von sieben Tagen und die HSV-1 342 hv infizierten Tiere innerhalb von zwölf Tagen Symptome entwickelten. Die um Faktor 2 geringere Viruslast von 5×10^5 TCID₅₀ reichte nicht aus, um bei allen Versuchstieren dieser beiden Gruppen eine letale Infektion zu induzieren (HSV-1 342 hv 2/3 und HSV-1 F 0/3) (Abb. 38). Auf Grundlage der erzielten Ergebnisse und der Tatsache, dass es sich bei HSV-1 F um einen gut etablierten Laborstamm handelt, wurde dieser für die weiteren Tierexperimente ausgewählt.

3.6.1.2. Dosisfindung der zur Prophylaxe einer HSV-Infektion erforderlichen mAk 2c Antikörpermenge

Zur initialen Bestimmung der mAk 2c Dosis, die NOD/SCID-Mäuse vor einer HSV-Infektion schützt, wurden zunächst jeweils drei Versuchstiere durch intravenöse Applikation unterschiedlicher Dosen des mAk 2c (300 µg/Maus und 100 µg/Maus) 24 h vor Infektion passiv immunisiert. Zum Zeitpunkt der Infektion betrug das Alter der Versuchstiere 6-10

Wochen. Es zeigte sich, dass bereits die Verabreichung von bereits 100 µg mAk 2c zur Protektion der Versuchstiere ausreichend war.

Zu genaueren Bestimmung der zur Prophylaxe einer HSV-Infektion benötigten Antikörpermenge wurde die Dosis des mAk 2c in einem weiteren Versuchsansatz weiter reduziert. Desweiteren wurde die Anzahl der Versuchstiere auf 6 pro Gruppe erhöht um statistisch Aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Die Gruppeneinteilung der Versuchstiere ist in Tab. 22 zusammengefasst.

Tab. 22: Dosisfindung der zur Prophylaxe einer HSV-Infektion benötigten Antikörper-Dosis

	Gruppe	Reagenz	Dosierung / Maus
1	Immuntherapie	mAk 2c	100 µg (5 mg/kg KG)
2	Immuntherapie	mAk 2c	50 µg (2,5 mg/kg KG)
3	Immuntherapie	mAk 2c	25 µg (1,25 mg/kg KG)
4	Immuntherapie	mAk 2c	10 µg (0,5 mg/kg KG)
5	Kontrolle	Humanes Anti-HSV-Serum	1 : 2 (entspr. 100 µg mAk 2c <i>in vitro</i>)
6	Kontrolle	PBS	200 µl

Als Kontrollen wurden PBS und polyklonales humanes anti-HSV-Serum mit einer 1:2 Verdünnung in PBS eingesetzt. Die Neutralisationseffizienz des verabreichten humanen Serums wurde zuvor *in vitro* untersucht und entsprach derjenigen einer Antikörper-Dosis von 100 µg mAk 2c. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 62 Tage. Beim Auftreten einer HSV-Symptomatik wurden die Versuchstiere umgehend getötet und zur weiterführenden Untersuchung nach Abschluss des Experiments eingefroren. Zusätzlich wurden zum Nachweis einer vorliegenden Infektion post mortem Vaginalspülungen entnommen. Die Überlebenskurven von HSV-1 F infizierten NOD/SCID-Mäusen nach passiver Immunisierung mit mAk 2c sind in Abb. 39 dargestellt.

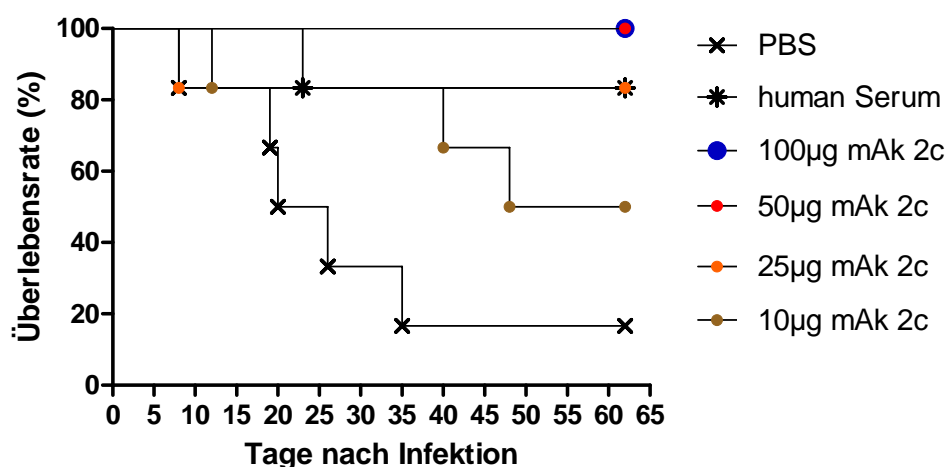


Abb. 39: Überlebensrate von HSV-1 F infizierten NOD/SCID-Mäusen nach passiver Immunisierung mit mAk 2c. Die Versuchstiere wurden durch Gabe unterschiedlicher Konzentrationen von mAk 2c prophylaktisch behandelt. Die Infektion erfolgte 24 h nach der Immunprophylaxe.

Eine passive Immunisierung mit mAk 2c Dosen $> 50 \mu\text{g}$ ($2,5 \text{ mg/kg KG}$) vermittelte einen vollständigen Schutz vor einer akuten Herpesinfektion und sicherte das Überleben aller Versuchstiere (Abb. 39). Eine Reduktion der Antikörper-Dosis auf $25 \mu\text{g}$ mAk 2 war nicht mehr ausreichend um alle Versuchstiere vor einer HSV-Infektion zu schützen, da ein Versuchstier infolge akuter HSV-Symptomatik am Tag 8 nach Infektion getötet werden musste (Abb. 39). Bei einer Dosis von $10 \mu\text{g}$ mAk 2c entwickelten 50 % der Versuchstiere eine HSV-Infektion und mussten infolge dessen an den Tagen 12, 40 und 48 getötet werden. Wie erwartet vermittelte humanes Serum keinen vollständigen Schutz vor einer HSV-Infektion, da ein Versuchstier am Tag 23 getötet werden musste. Ein Versuchstier der PBS-Kontrollgruppe hat überraschenderweise die Infektion überlebt. Folglich führt die Inokulation der Vaginalschleimhaut mit HSV -1 F nicht bei allen Versuchstieren zur Etablierung einer letalen Infektion. Desweiteren überlebten die Tiere der PBS-Kontrollgruppe mit 8, 19, 20, 26 und 35 um bis zu 26 Tage länger als vergleichsweise die HSV-1-F-infizierten Versuchstiere aus Vorversuch 3.6.1.1. Auch der Zeitrahmen, in dem es bei den PBS-Kontrolltieren zur Entwicklung einer HSV-Symptomatik kam, war im Vergleich zum vorangegangenen Versuch (7 Tage) mit 27 Tagen erheblich länger. Diese Unterschiede lassen sich mit großer Wahrscheinlichkeit auf das mit 6-10 Wochen deutlich höhere Alter der Versuchstiere im Vergleich zum vorangegangenen Versuch (4-6 Wochen) zurückführen. Insgesamt mussten während des Beobachtungszeitraums 10 Versuchstiere (5 Tiere der Behandlungsgruppen und 5 Tiere der PBS-Kontrollgruppe) aufgrund schwerwiegender Symptomatik getötet werden. Der Nachweis einer HSV-Infektion bei den getöteten Versuchstieren erfolgte durch Bestimmung der Viruslast in der Vaginalschleimhaut mittels Mikrotitration der Vaginalspülungen. Das Vorliegen einer generalisierten Infektion als Todesursache wurde durch Bestimmung der Viruslast in den Organen Niere, Nebenniere, Lunge, Herz, Gehirn und Rückenmark bestimmt. Unabhängig von der Konzentration des im Zuge einer Immunprophylaxe applizierten mAk 2c zeigten alle infolge einer akuten Symptomatik getöteten Versuchstiere eine zu den Tieren der PBS-Kontrollgruppe vergleichbare Virusverteilung im Organismus. Zur Veranschaulichung wird exemplarisch die Viruslast in den untersuchten Organen der Versuchstiere der PBS-Kontrollgruppe dargestellt (Abb. 40).

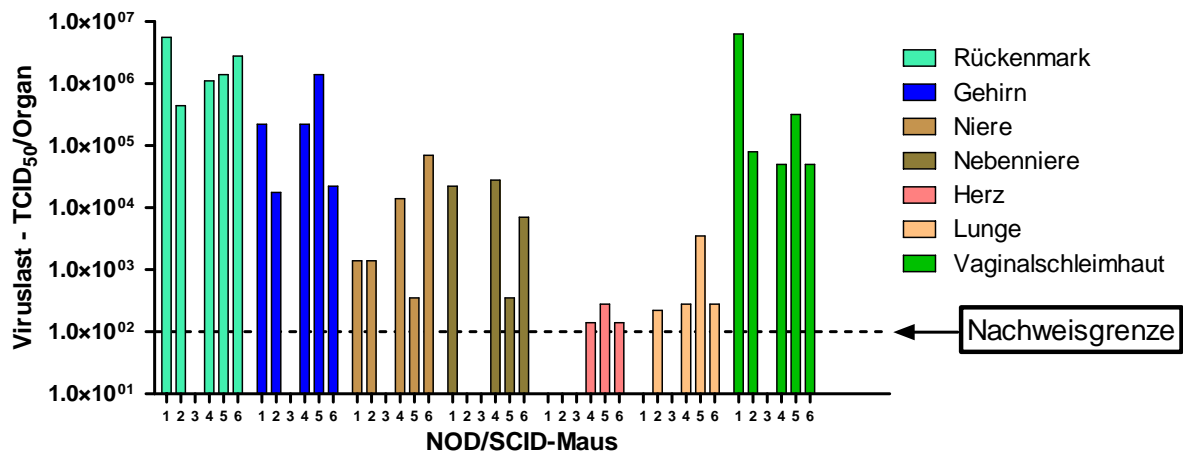


Abb. 40: Viruslast in Organen der PBS-behandelten Kontrolltiere. Die Viruslast in den Organen wurde durch Bestimmung des Virustiters nach Entnahme und Homogenisierung der Organe im Mikrotitrationsverfahren bestimmt. Der Virustiter in der Vaginalschleimhaut wurde entsprechend durch Mikrotitration der Vaginalspülungen ermittelt. Die untere Nachweisgrenze betrug 1×10^2 TCID₅₀. Als Negativ-Kontrolle wurde die Viruslast in den Organen der PBS-behandelten, nicht erkrankten Maus Nr. 3 untersucht.

Bei allen 10 untersuchten Versuchstieren die infolge einer akuten Symptomatik getötet werden mussten konnte insbesondere in der Vaginalschleimhaut, dem Rückenmark und im Gehirn eine hohe Viruslast ($\sim 1 \times 10^6$ TCID₅₀ / Organ) nachgewiesen werden. In der Niere und Nebenniere konnte bei 9 bzw. 7 Tieren eine mittlere Viruslast ($\sim 1 \times 10^4$ TCID₅₀ / Organ) nachgewiesen werden. In der Lunge und im Herzen dagegen konnte das Virus nur bei 6 bzw. 5 Versuchstieren knapp oberhalb der Nachweisgrenze von 1×10^2 TCID₅₀ nachgewiesen werden. Der Mittelwert der in den Organen nachgewiesenen Virusmenge ist in der Tab. 23 zusammengefasst.

Tab. 23: Mittlere Viruslast in Organen von Mäusen mit einer generalisierten HSV-Infektion

Organ	Viruslast TCID ₅₀ / Organ
Vaginalschleimhaut	$1,4 \times 10^6$
Rückenmark	$2,3 \times 10^6$
Gehirn	$3,8 \times 10^5$
Niere	$1,7 \times 10^4$
Nebenniere	$1,1 \times 10^4$
Lunge	$1,1 \times 10^3$
Herz	$1,9 \times 10^2$

Die Untersuchung der Viruslast in Organen von Versuchstieren die das Experiment ohne Symptomatik überlebt haben zeigte, dass mAk 2c nicht nur den letalen Verlauf der Infektion verhinderte, sondern auch das Virus vollständig neutralisierte. Weder in der Vaginalschleimhaut noch in einem der untersuchten Organe der Versuchstiere, die mit 100 µg bzw. 50 µg mAk 2c behandelt wurden, konnte infektiöses Virus nachgewiesen werden.

Abschließend zu den Vorversuchen lässt sich zusammenfassen, dass für die Etablierung einer HSV-Infektion im NOD/SCID-Mausmodell sowohl das Alter der Versuchstiere zum Zeitpunkt der Infektion (4-6 Wochen) als auch die zur Infektion eingesetzte Virusmenge (1×10^6 TCID₅₀) entscheidend ist.

3.6.2. Immunprophylaxe einer HSV-1 F Infektion durch hu2c V1

Vergleichend mit dem parentalen murinen Antikörper mAk 2c sollte der humanisierte Antikörper mAk hu2c V1 hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Prophylaxe einer ansonsten letal verlaufenden HSV-Infektion im NOD/SCID-Mausmodell untersucht werden. Auf Grundlage der Ergebnisse aus den Vorversuchen wurde zum einen das Alter der Versuchstiere einheitlich mit 4-5 Wochen gewählt und zum anderen die Gruppengröße auf 8-9 Versuchstiere erweitert, da die Virus-Inokulation nicht bei allen Versuchstieren zu einer Infektion führte. Die Versuchstiere wurden durch intravenöse Applikation unterschiedlicher Antikörpermengen 24 h vor intravaginaler Infektion passiv immunisiert. Der Nachweis und Verlauf einer erfolgreichen HSV-Infektion erfolgte durch Bestimmung des Virustiters aus Vaginalschleimhaut-Spülungen (20 µl PBS) zum Zeitpunkt 24 h, 30 h sowie an Tagen 2, 4, 6 und 8 nach Infektion. Die Anzahl der Versuchstiere mit einer nachgewiesenen Infektion und die Dosis der applizierten Antikörper mAk hu2c V1 bzw. mAk 2c sind in Tab. 24 zusammengefasst.

Tab. 24: Prophylaxe der HSV-Infektion durch mAk hu2c V1 und mAk 2c. Übersichtstabelle.

	Reagenz	Dosis µg/Maus	Dosis mg/kg Körpergewicht	Infizierte Mäuse / Gruppengröße
Gruppe 1	mAk 2c	300	15	9/9
Gruppe 2	mAk 2c	100	5	7/8
Gruppe 3	mAk 2c	50	2,5	6/8*
Gruppe 4	hu2c V1	300	15	8/9
Gruppe 5	hu2c V1	100	5	7/8
Gruppe 6	hu2c V1	50	2,5	8/8
Gruppe 7	PBS	xxx	xxx	6/8

* ein Versuchstier zu Versuchsbeginn verstorben

Wie in Abb. 41 dargestellt, korrelierte die Eliminierung der Viruslast in der Vaginalschleimhaut mit steigender Antikörper-Dosis.

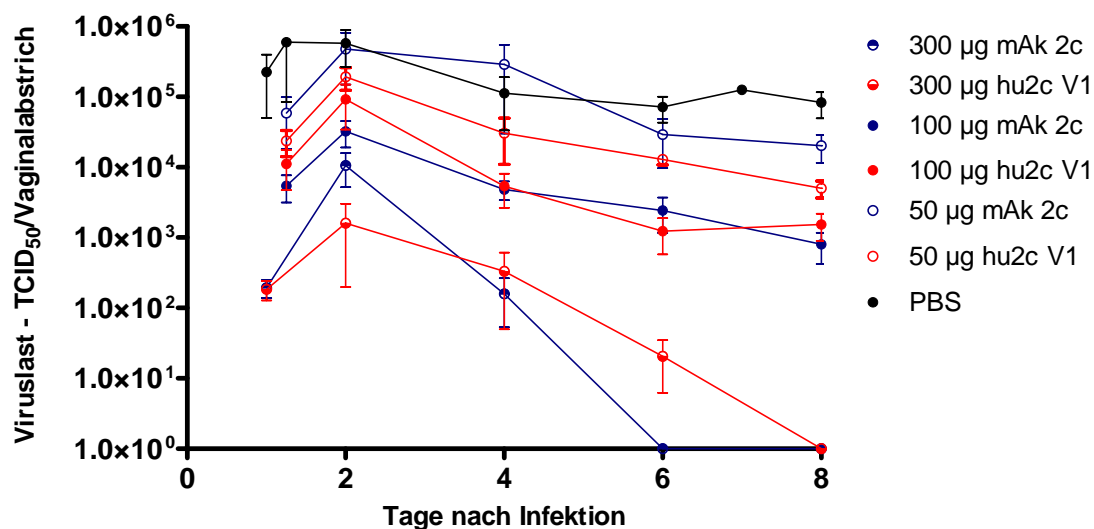


Abb. 41: Eliminierung der HSV-Replikation in der Vaginalschleimhaut durch passive Immunisierung mit mAk hu2c V1 und mAk 2c. NOD/SCID-Mäuse wurden durch Gabe der neutralisierenden Antikörper mAk 2c (blau) und mAk hu2c V1 (rot) passiv Immunisiert. Die intravaginale Infektion mit einer Viruslast von 1×10^6 TCID₅₀ HSV-1 F erfolgte 24 h nach Verabreichung der Antikörper.

Die Gabe einer Antikörper-Dosis von 300 µg mAk 2c bzw. mAk hu2c V1 induzierte eine vollständige Eliminierung des Virus aus der Vaginalschleimhaut nach 6-8 Tagen (Abb. 41). Die Applikation von 100 µg des jeweiligen monoklonalen Antikörpers reduzierte die Viruslast in der Vaginalschleimhaut der Tiere im Vergleich zu PBS-Kontrolltieren nahezu um den Faktor 1000. Bei einer Dosierung von 50 µg induzierten beide Antikörper eine Herabsenkung der Viruslast um den Faktor 10. Die PBS-Kontrolltiere zeigten dagegen einen gleichbleibend hohen Virustiter in der Vaginalschleimhaut während der ersten 8 Tage bzw. bis zum Auftreten einer akuten HSV-Symptomatik.

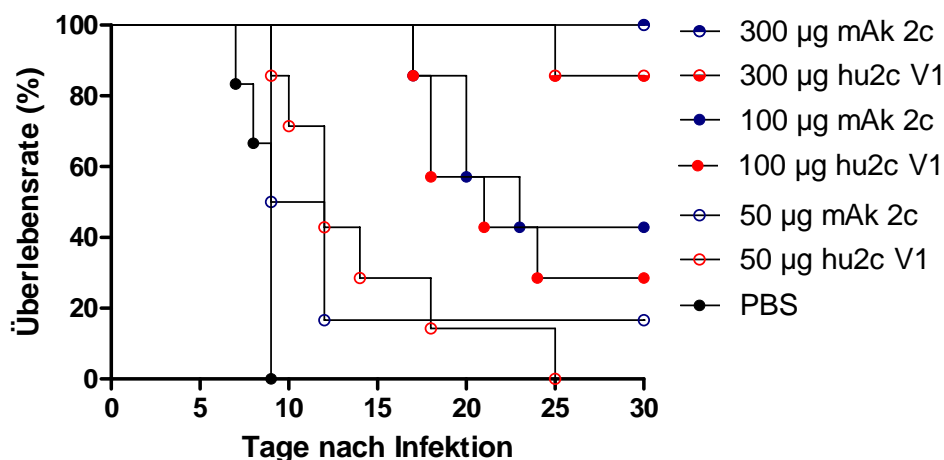


Abb. 42: Überlebensrate von HSV-1 F infizierten NOD/SCID-Mäusen nach passiver Immunisierung mit mAk hu2c V1 und mAk 2c. Jeweils 8-9 Versuchstiere pro Gruppe wurden 24 h vor Infektion durch Gabe unterschiedlicher Antikörpermengen prophylaktisch behandelt. Die Kontrolltiere erhielten eine Behandlung mit PBS.

Das Überleben der Versuchstiere korrelierte direkt mit dem Virustiter in der Vaginalschleimhaut. Ebenso zeigten der humanisierte Antikörper und der parentale Antikörper eine vergleichbare Wirksamkeit in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis. Beide monoklonalen Antikörper vermittelten einen vollständigen Schutz vor einer letalen HSV-Infektion bei einer Dosis von 300 µg. Einzige Ausnahme stellte die am Tag 25 verstorbene, mit 300 µg mAk hu2c V1 behandelte Maus dar. Jedoch wies diese Maus keine typischen Symptome einer HSV-Infektion auf. Die zur Klärung der Todesumstände durchgeführte Obduktion lieferte keinen eindeutigen Hinweis auf die tatsächliche Todesursache. Im Rückenmark der Maus konnte das Herpesvirus mit einem niedrigen Titer von 1×10^3 TCID₅₀ nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Daten aus Versuch 3.6.1.2 ist dieser Titer jedoch um den Faktor 1000 geringer als der entsprechende Titer im Rückenmark von Mäusen die aufgrund einer akuten HSV-Symptomatik getötet werden mussten. Im Gehirn wurde dagegen kein Virus nachgewiesen, was gegen eine HSV-Infektion als Todesursache spricht. Die Immunprophylaxe mit jeweils 100 µg mAk hu2c V1 bzw. mAk 2c lieferte keinen vollständigen Schutz mehr vor einer Infektion. Es konnten nur 3/7 (hu2c V1) bzw. 2/7 (mAk 2c) Mäuse vor einem letalen Verlauf geschützt werden (Abb. 42). Bei einer weiteren Reduktion der Antikörper-Dosis auf 50 µg konnte die Ausbildung einer akuten HSV-Infektion nicht mehr verhindert werden. Es überlebte nur eine Maus den gesamten Beobachtungszeitraum von 30 Tagen. Die übrigen Versuchstiere wurden aufgrund akuter HSV-Symptomatik zwischen Tag 10 und 25 getötet. Insgesamt konnte jedoch das Überleben der Tiere im Vergleich zu der PBS-Kontrollgruppe um 3-18 Tage verlängert werden. Versuchstiere der PBS-Kontrollgruppe mussten auf Grund von HSV-Symptomatik in dem Zeitraum von Tag 7-9 getötet werden (Abb. 42).

Im Vergleich zum Vorversuch war zum Vollständigen Schutz der Versuchstiere vor einer letal verlaufenden HSV-Infektion eine 6-fach höhere Antikörperdosis erforderlich. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das geringere Alter der in diesem Versuch eingesetzten Versuchstiere zurückzuführen. Um die Ergebnisse der weiteren Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde das Alter der Versuchstiere konstant bei 4-5 Wochen zum Versuchsbeginn gehalten.

3.6.3. Postexpositions-Prophylaxe von HSV1 F infizierten NOD/SCID-Mäusen mit mAk hu2c V1

Nachdem die Wirksamkeit des mAk hu2c V1 anhand einer passiven Immunisierung demonstriert werden konnte, sollte auch seine Fähigkeit zur Eliminierung einer bestehenden HSV-Infektion untersucht werden. Da es zurzeit kein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung einer akuten HSV-Infektion mit einer bereits ausgeprägten Symptomatik gibt, wurde das therapeutische Potential des Antikörpers im Rahmen einer Postexpositions-Prophylaxe-Studie untersucht. Dazu wurden jeweils 9 Versuchstiere pro Gruppe mit mAk 2c oder mAk hu2c V1 behandelt. Da der Replikationszyklus des Herpes-Simplex-Viren t durchschnittlich 16 Stunden dauert (173), wurden die neutralisierenden Antikörper zu drei aufeinanderfolgenden Zeitpunkten, 24 h, 40 h und 56 h nach Infektion, verabreicht. Die Antikörper wurden analog des bereits klinisch zur Behandlung von RSV-Infektionen eingesetzten humanisierten Antikörpers Palivizumab mit einer Dosis von jeweils 300 µg / Maus intravenös (15 mg/kg KG) appliziert (149). Die Infektion und Virusreplikation wurde durch Mikrotitration der Vaginalspülungen zu den Zeitpunkten 1, 2, 4, 6 und 8 Tage nach Infektion kontrolliert. (Abb. 43). Eine HSV-Replikation in der Vaginalschleimhaut konnte jeweils bei 8 von 9 Versuchstieren 24 h nach Infektion nachgewiesen werden. Um die Tierversuchszahl auf das nötigste zu beschränken, wurde die PBS-Kontrollgruppe aus Versuch 3.6.2 als Kontrolle herangezogen.

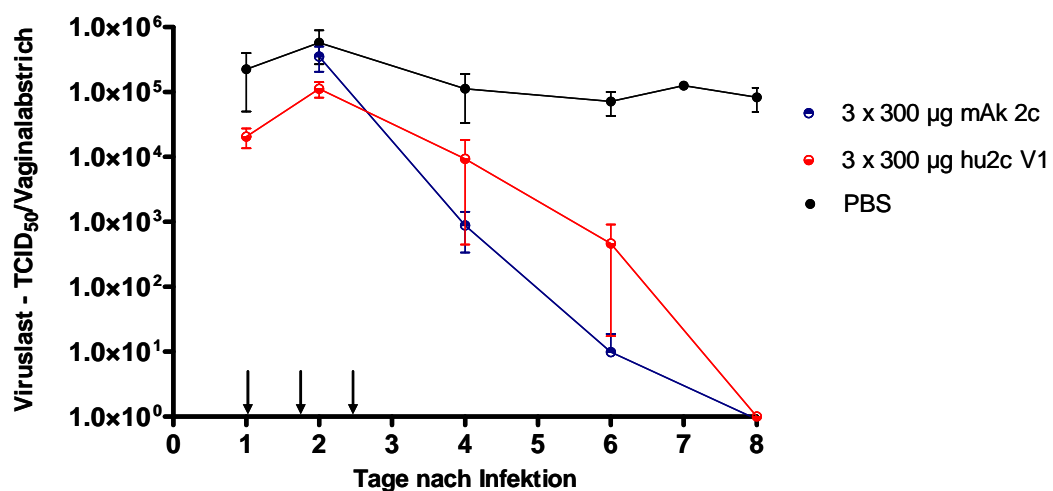


Abb. 43: Eliminierung der HSV-Replikation in der Vaginalschleimhaut durch Postexpositions-Prophylaxe mit mAk hu2c V1 und mAk 2c. NOD/SCID-Mäuse wurden durch Inokulation der Vaginal-Schleimhaut mit 1×10^6 TCID₅₀ HSV-1 F infiziert. Die Gabe der neutralisierenden Antikörper mAk 2c (blau) und mAk hu2c V1 (rot) erfolgte durch Injektion in die Schwanzvene 24 h, 40 h und 56 h nach Infektion (Pfeile). Im Vergleich ist die Virusreplikation in der Vaginalschleimhaut der PBS-behandelten Tiere aus Versuch 3.6.2 dargestellt (schwarz). Abgebildet sind die an Tagen 1, 2, 4, 6 und 8 bestimmten Virustiter in der Vaginalschleimhaut infizierter Versuchstiere.

Die Versuchstiere wurden über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Die Gabe neutralisierender Antikörper schützte alle behandelten Versuchstiere vor der Ausbildung einer symptomatischen HSV-Infektion und dem damit assoziierten letalen Verlauf (Abb. 44). Eine Ausnahme stellte jeweils eine mit mAk 2c bzw. mAk hu2c V1 behandelte Maus dar. Die Versuchstiere mussten aufgrund einer ungeklärten Krankheits-Symptomatik an Tagen 18 bzw. 25 getötet werden. Zur Klärung der Ursache wurden beide Versuchstiere obduziert. Im Rückenmark der mit mAk hu2c V1 behandelten Maus konnte bei einer Nachweisgrenze von 100 TCID₅₀/Organ kein Virus nachgewiesen werden. Die mAk 2c behandelte Maus wies im Rückenmark mit 2×10^3 TCID₅₀ eine Viruslast auf die im Vergleich zur PBS-behandelten Kontrollgruppe mit einer generalisierten Infektion (3.6.1.2) 500-fach geringer war. In beiden Tieren konnte kein Virus im Gehirn der verstorbenen Tiere detektiert werden. Abschließend lässt sich sagen, dass sich der Grund für die beobachtete Symptomatik und die damit assoziierte Todesursache bei beiden Versuchstieren nicht eindeutig feststellen ließ.

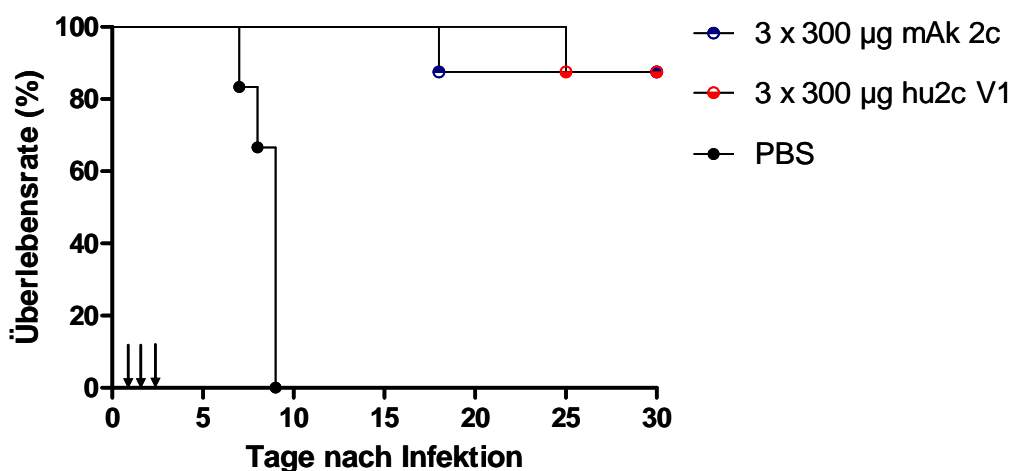


Abb. 44: Überlebensrate von HSV-1 F infizierten Versuchstieren nach Postexpositions-Prophylaxe mit mAk hu2c V1 und mAk 2c. Die Versuchstiere wurden durch dreimalige Gabe einer Antikörper-Dosis von jeweils 300 µg mAk 2c (blau) oder mAk hu2c V1 (rot) 24 h, 40 h und 56 h nach Infektion behandelt (Pfeile). Im Vergleich ist die Überlebensrate der PBS-behandelten Tiere aus Versuch 3.6.2 dargestellt.

3.6.4. Postexpositions-Prophylaxe von NOD/SCID-Mäusen nach Infektion mit dem multiresistenten Isolat HSV-1 R10.2

Abschließend sollte die Wirksamkeit des humanisierten mAk hu2c V1 gegenüber einer HSV-Infektion mit dem ACV und PFA multiresistenten sowie gegenüber CDV vermindert sensitiven Stamm des Patientenisolates HSV-1 R10 *in vivo* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde von HSV-1 R10 in der Zellkultur ein Virusstock mit einem hohen Virustiter von 8×10^7 TCID₅₀/ml hergestellt (HSV-1 R10.2). Der multiresistente Stamm HSV-1 R10.2 zeichnete sich durch eine zum Laborstamm HSV-1 F vergleichbare Virulenz im Mausmodell aus. Mit einer Viruslast von 1×10^6 TCID₅₀ HSV-1 R10.2 konnten im Rahmen eines Vorversuches zunächst 2 von 3 Versuchstieren erfolgreich infiziert werden. Beide Versuchstiere mussten am Tag 8, ähnlich der Überlebensdauer der HSV-1 F infizierten Mäuse (3.6.1.1), auf Grund ausgeprägter HSV-Symptomatik getötet werden.

Zur Untersuchung der antiviralen Wirksamkeit des mAk hu2c V1 in diesem Infektions-Modell wurden drei Versuchsgruppen mit jeweils 9 Versuchstieren (Tab. 25) gebildet und die Tiere am Tag 0 mit einer Viruslast von 1×10^6 TCID₅₀ HSV-1 R10.2 intravaginal infiziert.

Tab. 25: Postexpositions-Prophylaxe der HSV-1 R10.2 Infektion durch mAk hu2c V1. Übersichtstabelle.

	Gruppe	Reagenz	Behandlung	Applikationsart
1	Kontrolle	PBS	3 x 200 µl	i.v.
2	Immuntherapie	mAk hu2c V1	3 x 15 mg/kg KG (300 µg)	i.v.
3	Virustatikum	Aciclovir (ACV)	2 x tgl. 50 mg/kg KG	i.p.

Analog zu Versuch 3.6.3 erhielten Tiere der Antikörper-Behandlungs-Gruppe und der PBS-Kontrollgruppe durch intravenöse Gabe 24 h, 40 h und 56 h nach Infektion entweder jeweils 15 mg/kg Körpergewicht (ca. 300 µg) mAk hu2c V1 oder 200 µl PBS. Zusätzlich wurde eine Gruppe von Versuchstieren durch intraperitoneale ACV-Gabe in einer Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht in einem Abstand von jeweils 12 Stunden, beginnend 24 h nach Infektion, über den gesamten Versuchszeitraum behandelt (62, 81). Der Verlauf der HSV-Infektion wurde anhand von Vaginalschleimhaut-Spülungen an Tagen 1, 2, 4, 6 und 8 durch Bestimmung der Viruslast kontrolliert. In der PBS-Kontrollgruppe wurden 7 von 9, in der Antikörper-Behandlungs-Gruppe 8 von 9 und in der ACV- Gruppe 9 von 9 Versuchstiere als infiziert bestimmt.

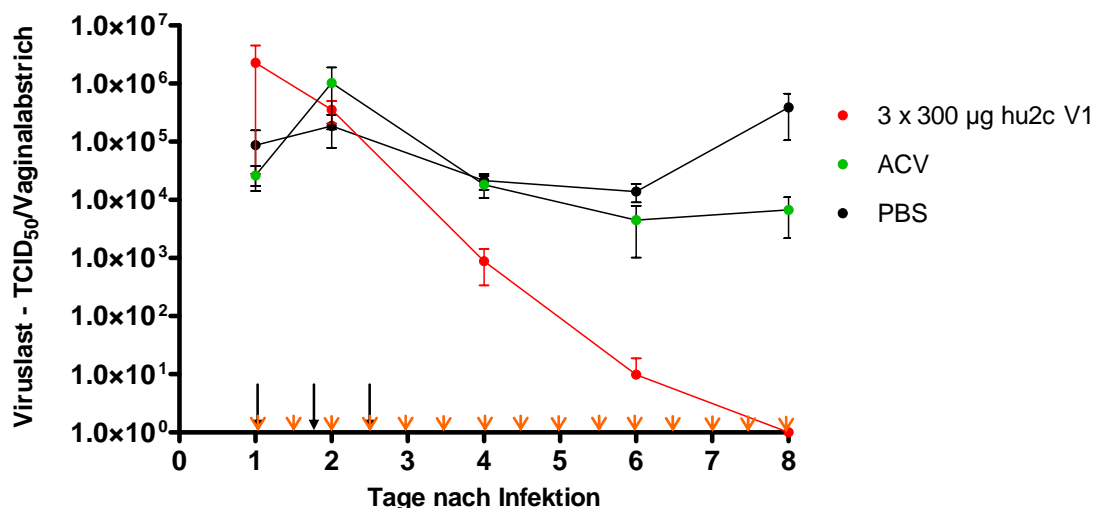


Abb. 45: Verlauf der Virusreplikation in der Vaginal-Schleimhaut HSV-1 R10.2 infizierter NOD/SCID-Mäuse. NOD/SCID-Mäuse wurden durch Inokulation der Vaginal-Schleimhaut mit 1×10^6 TCID₅₀ HSV-1 R10.2 infiziert. Die Gabe des mAk hu2c V1 (rot) erfolgte durch Injektion in die Schwanzvene 24 h, 40 h und 56 h nach Infektion (schwarze Pfeile). Die Verabreichung von ACV erfolgte intraperitoneal über den gesamten Beobachtungszeitraum im Abstand von 12 h, beginnend 24 h nach Infektion (orange Pfeile). Die Viruslast wurde durch Mikrotitration der Vaginalspülungen von Mäusen der einzelnen Gruppen über einen Zeitraum von 8 Tagen bestimmt.

Der humanisierte Antikörper eliminierte die Replikation des multiresistenten Stammes HSV-1 R10.2 in der Vaginal-Schleimhaut ebenfalls wie im Fall einer Infektion mit dem Laborstamm HSV-1 F. Die ACV-Behandlung konnte zwar am Tag 8 die Viruslast im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrolltieren um den Faktor 26 reduzieren, jedoch schützte die Tiere aufgrund der ACV-Resistenz des verwendeten Virusstammes nicht vor einem letalen Verlauf der HSV-Infektion (Abb. 46).

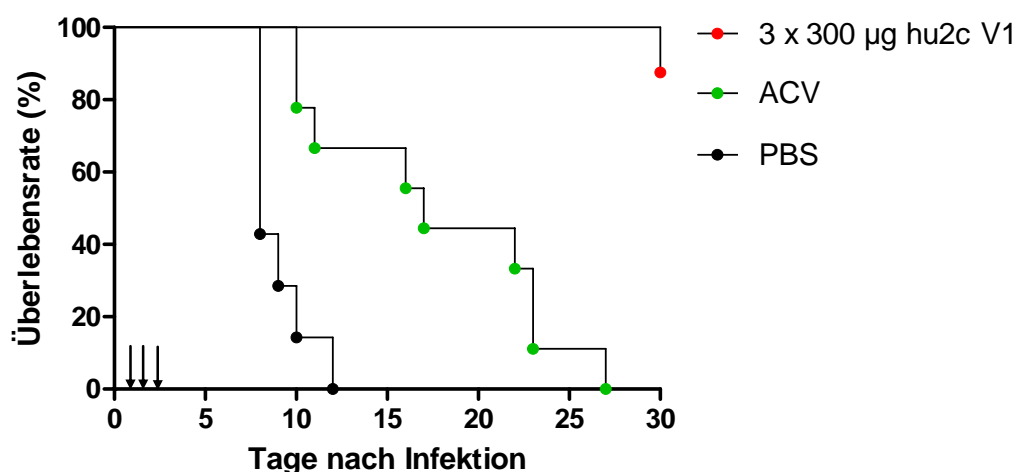


Abb. 46: Postexpositions-Prophylaxe von HSV-1 R10.2 infizierten NOD/SCID-Mäusen mit mAk hu2c V1. Infizierte Versuchstiere wurden durch dreimalige Gabe von 300 µg mAk hu2c V1 (rot) 24 h, 40 h und 56 h nach Infektion behandelt (schwarze Pfeile). Zur Kontrolle wurde entweder PBS (schwarz) oder ACV (grün) eingesetzt. Die Gabe von ACV erfolgte alle 12 h intraperitoneal bei einer Dosierung von 50 mg/kg Körpergewicht.

Die Gabe von ACV verlängerte das Überleben der Versuchstiere im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe um 2-15 Tage. Die PBS-behandelten Kontrolltiere mussten aufgrund akuter Herpes-Symptomatik zwischen Tag 8 und Tag 12 getötet werden. Die Überlebensdauer entsprach damit derjenigen von HSV-1 F infizierten Tieren (3.6.3). Im Vergleich dazu zeigte mAk hu2c V1 auch im Zuge einer postexpositions-prophylaktischen Behandlung im Fall einer Infektion mit einem Virustatika-resistenten Stamm eine eindrucksvolle Wirksamkeit. Der letale Infektionsverlauf wurde in 7 von 8 Fällen verhindert (Abb. 46). Eine Antikörper-behandelte Maus, welche am Tag 30 infolge einer HSV-Symptomatik getötet werden musste, wies im Vergleich zu den anderen infizierten Versuchstieren eine um den Faktor 100 höhere Viruslast zum Zeitpunkt von 24 h nach Infektion auf. Die Behandlung mit mAk hu2c V1 reduzierte die Viruslast in der Vaginalschleimhaut dieser Maus innerhalb von 8 Tagen unterhalb der Nachweisgrenze von 1×10^2 TCID₅₀, jedoch reichte wahrscheinlich zur vollständigen Eliminierung des Virus aus dem Organismus nicht aus. Die durchgeführten Versuche lassen die Schlussfolgerung zu, dass mAk hu2c V1 Virusstämme mit Resistenzen gegenüber den gängigen antiviralen Medikamenten (ACV, PFA und CDF) mit der gleichen Effektivität neutralisiert wie Virusstämme ohne Virustatika-Resistenzen.

4. Diskussion

Reaktivierungen von latent persistierenden Herpes Simplex Viren werden bei Patienten mit Immunsuppression häufig beobachtet und sind mit teilweise schweren Krankheitsverläufen assoziiert (4, 91). Der dadurch notwendige und langandauernde Einsatz etablierter Virustatika führt insbesondere bei Risikopatienten wie HIV/AIDS-Infizierten, Organempfängern und bei Patienten nach Knochenmarktransplantation zunehmend zur Entwicklung resistenter Herpes Simplex Viren (12, 47). Die Folge sind disseminiert verlaufende HSV-Infektionen, die eine extrem rasch fortschreitende, generalisierte Erkrankung etablieren können, die bei zu spätem Erkennen bzw. Verabreichung eines unwirksamen Virustatikums innerhalb weniger Tage zum Tode führen kann. Neue Behandlungsmöglichkeiten zur Prophylaxe und Therapie von HSV-Reaktivierungen bei immunsupprimierten Patienten sind daher dringend erforderlich.

Ein vielversprechende Alternative zu Virustatika stellt der bereits für andere Viren erprobte Einsatz von antiviralen Immunglobulinen dar (30, 90, 104, 113, 163). Der murine monoklonale Antikörper (mAk) 2c erwies sich im Zuge früherer Arbeiten bereits als äußerst effizient sowohl in der Neutralisation freier Herpes Simplex Viren als auch in der Inhibition der direkten Virusausbreitung über den „cell-to-cell spread“. Darüber hinaus induzierte mAk 2c in einem dem natürlichen Infektionsablauf beim Menschen nahekommenden Mausmodell eine vollständige Virus-Eliminierung und verhinderte dadurch bei allen behandelten Versuchstieren den ansonsten letalen Infektionsverlauf (60, 61). Da Antikörper mit diesen potenten Eigenschaften im Zuge der humoralen Immunantwort beim Menschen nicht oder nur in einem geringen Umfang gebildet werden, sollte mAk 2c im Rahmen dieser Arbeit als neues Therapiekonzept zur Prophylaxe und Therapie von HSV-Reaktivierungen weiterentwickelt werden. Zu diesem Zweck sollten zunächst die Bindungseigenschaften und die Wirksamkeit des mAk 2c im direkten Vergleich mit den Antikörperfragmenten 2c-F(ab')₂, 2c-Fab und 2c-scFv *in vitro* untersucht werden. Diese Experimente sollten Hinweise zur Wirkungsweise des mAk 2c liefern und klären, ob die Antikörpervalenz (monovalent vs. bivalent) bzw. die Fc-Domäne einen Einfluss auf die Wirksamkeit des mAk 2c haben. Zur Nutzbarmachung des mAk 2c als antivirales Therapeutikum im Patienten sollte schließlich die Immunogenität des murinen Antikörpers durch eine Antikörper-Humanisierung reduziert werden. Ziel dieser Arbeit war es einen für den Menschen gut verträglichen humanisierten Antikörper, der gleichzeitig die potenten antiviralen Eigenschaften des murinen Antikörpers beibehält, zu generieren und präklinisch sowohl *in vitro* wie auch im Tiermodell zu evaluieren.

4.1. Funktionelle Charakterisierung des mAk 2c und seiner Derivate *in vitro*

Antivirale Antikörper können in unterschiedlichen Phasen des viralen Infektionszyklus eingreifen und das Virus dadurch neutralisieren. Ihre Hauptfunktion stellt vor allem die Neutralisation von zirkulierenden Viren dar. Durch spezifische Bindung der Antikörper, zum Beispiel an virale Oberflächenantigene, können sie die Wechselwirkung zwischen viralen Liganden und zellulären Rezeptoren, Lipiden oder Kohlenhydraten inhibieren und somit die Adsorption der Viren an Zielzellen verhindern. Antikörper mit diesem Wirkmechanismus sind beispielsweise für das humane Immundefizienzvirus HIV-1 oder auch Influenzaviren beschrieben. Infolge einer spezifischen Bindung der Antikörper mAk F105 bzw. Fab HC19 an die viralen Oberflächenantigene HIV-1 gp120 bzw. Influenza Hämagglutinin (HA) wird die Virusadsorption an die Zielzellen wirksam inhibiert (18, 70, 164). Bei Infektionen mit dem West Nil Virus wurden im Gegensatz dazu eine Neutralisation durch menschliche Antikörper erst nach bereits erfolgter Virusadsorption beschrieben (208). Die Adsorption von Herpes Simplex Viren an Wirtszellen und die darauffolgende Fusion der Virusmembran mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle erfordert das Zusammenspiel der viralen Glykoproteine gC, gB, gD und gH/gL (15). Das Andocken der Viruspartikel an die Wirtszellen wird durch Interaktion der viralen Glykoproteine gB und gC mit zellulären Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG) vermittelt (87). Diese initiale Bindung an HSPG verstärkt die Ausbildung der zur Infektion der Wirtszelle essentiellen Bindungen von gD an die Rezeptoren Nectin-1, HVEM („*herpesvirus entry mediator*“) oder 3-O-modifizierten HSPG sowie von gB an PIRLa („*paired immunoglobulin-like type 2 receptor*“) und weitere noch nicht identifizierte Rezeptoren (15, 16, 177). Der murine Antikörper mAk 2c erkennt ein hochkonserviertes Epitop des Glykoproteins B von HSV-1 und HSV-2 und ist zur effizienten Virusneutralisation in der Lage (60, 61). Zur Charakterisierung des Wirkungsmechanismus des mAk 2c wurde zunächst die Neutralisationseffizienz des Antikörpers im Vergleich mit polyklonalem humanen Immunglobulin in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Antikörper-Applikation, die entweder vor oder nach der Adsorption der Viruspartikel an die Zielzellen erfolgte, untersucht. Die Ergebnisse zeigten einen deutlichen Unterschied in der Wirkungsweise zwischen mAk 2c und humanen Antikörpern (3.2.4). Im Gegensatz zu humanen polyklonalen Antikörpern, deren Wirksamkeit überwiegend auf der Hemmung der Adsorption freier Herpesvirionen an Wirtszellen basiert, neutralisierte mAk 2c freie Viruspartikel mit gleicher Effizienz wie an die Wirtsmembran adsorbierte Viruspartikel. Die neutralisierende Wirkung des mAk 2c lässt sich daher nicht auf die Inhibition der Virusadsorption an die Zielzelle zurückführen. Die Bindung des mAk 2c an gB interagiert

daher vermutlich mit einem Vorgang nach erfolgter Virusadsorption und während des Fusionsprozesses zwischen Virus- und Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Die Fusion der Virusmembran mit der Zytoplasmamembran der Zielzelle wird beim Influenza Virus, Dengue-Virus oder dem Vesicular Stomatitis Virus jeweils durch alleinige Wirkung eines einzelnen entsprechenden Fusionsproteins (Hämaggglutinin, Denguevirus-E-Protein, bzw. VSV-G-Proteins) katalysiert (147, 171, 172, 186). Bei Herpes Simplex Viren stellt der Fusionsprozess einen bis heute noch nicht vollständig verstandenen, sehr komplexen Vorgang dar, der das Zusammenwirken der Proteine gB, gD und gH/gL erfordert (188, 189, 199). Die Entschlüsselung der Kristallstrukturen von gD (125), gB (88) und des heterodimeren Komplexes gH/gL (40) wie auch die Untersuchungen der Interaktionen zwischen den Proteinen gD und gB, gD und gH/gL sowie gB und gH/gL mit Hilfe von bimolekularen Komplementationsanalysen lieferten im Verlauf der vergangenen 10 Jahre wichtige Hinweise zur Aufklärung des Fusionsmechanismus (7, 8). Nach dem gegenwärtigen Modell wird davon ausgegangen, dass zunächst das Glykoprotein gD nach Bindung an einen der korrespondierenden zellulären Rezeptoren eine Konformationsänderung eingeht, und dadurch den Fusionsvorgang einleitet (8). Im Zuge des Fusionsprozesses kommt es entweder unabhängig oder als direkte Folge der Bindung von gD an gB zur Konformationsänderung von gB und zur Integration der Fusionsschleifen von gB in die Zytoplasmamembran der Wirtszelle (83, 85, 185). Die anschließende Fusion der Virusmembran mit der Zytoplasmamembran erfolgt durch gD-vermittelte Assoziation von gB mit dem Proteinkomplex gH/gL (8). Es ist bisher unklar, welche Rolle dabei die Bindung des gB an PIRL α bzw. einen noch nicht identifizierten Rezeptor und die Rolle der Bindung von gH/gL an V β 3 Integrin oder einen anderen zellulären Interaktionspartner spielt (74, 177). Obwohl fusogene Eigenschaften sowohl bei gD als auch bei gH/gL beobachtet werden konnten, stellt gB das tatsächliche Fusionsprotein der Herpes Simplex Viren 1 und 2 dar (199). Die vergleichenden Kristallstrukturen der Postfusionskonformationen von HSV-gB mit den Fusionsproteinen VSV-G und Baculovirus gp64 führte zur Eingliederung des gB in eine neu definierte Kategorie von Fusionsproteinen, der Klasse III (86, 194). Das gB lässt sich insgesamt in fünf strukturelle Subdomänen unterteilen (Abb. 5). Die Domänen I und II weisen dabei Gemeinsamkeiten mit sogenannten "Plekstrin-Homologie"-Domänen auf, welche zur Initiation der Bindung zu anderen Proteinen oder auch Membranlipiden in der Lage sind (88, 111, 134). Gemessen an der Beteiligung der gB-Subdomänen an unterschiedlichen Vorgängen des Fusionsprozesses konnte das gB in drei funktionelle Regionen (FR1-FR3) unterteilt werden, die an der Integration von Fusionsschleifen in die Zytoplasmamembran (FR1), der

Interaktion mit dem gH/gL-Komplex (FR2) oder der Bindung an einen zellulären Rezeptor (FR3) beteiligt sind (8, 83, 85).

Bindungsstudien mit 67 verschiedenen monoklonalen, gB-spezifischen Antikörpern zeigten, dass diese drei unterschiedliche Arten von Epitopen erkennen. Es handelt sich dabei um kontinuierliche, diskontinuierliche, und gegenüber einer Denaturierung zum Teil resistente sogenannte pseudokontinuierliche Epitope (15). Die Charakterisierung der Bindungseigenschaften des mAk 2c gegenüber extrazellulärem gB Protein, welches freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. R. Eisenberg (University of Pennsylvania, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt wurde, mit Hilfe der Western-Blot Analyse unter reduzierenden bzw. nichtreduzierenden Bedingungen zeigte, dass mAk 2c ein pseudokontinuierliches Epitop erkennt (3.2.1). Das Ergebnis korreliert mit der Identifizierung zweier Bindestellen des mAk 2c innerhalb der FR1 (F175-G184 und Y303-E305) im Rahmen zuvor durchgeführter Bindungsanalysen mittels Peptid-Analysen (Eis *et. al.*, unveröffentlichte Daten). Die Übertragung dieser Daten auf die dreidimensionale Molekularstruktur des Glykoproteins B zeigte, dass diese Bindestellen in der postulierten Postfusions-Konformation von gB räumlich voneinander separiert sind (Abb.5). Drastische Konformationsänderungen während des Fusionsprozesses wurden bereits für das dem HSV-gB-Protein strukturhomologe Fusionsprotein VSV-G beschrieben (171, 172) und sind auch für das gB von HSV anzunehmen (88). Es ist daher am wahrscheinlichsten, dass mAk 2c an das gB zu einem Zeitpunkt bindet, an dem sich dieses noch in einem Präfusions-Zustand befindet und dessen Konformationsänderung im Verlauf des Fusionsprozesses maßgeblich beeinträchtigt. Aufgrund der Epitopspezifität des mAk 2c im Bereich einer der beiden beschriebenen Fusionsschleifen (84) sollte untersucht werden, ob der gB-induzierte Fusionsprozess und damit auch die Virusinfektion bereits durch Bindung eines monovalenten 2c-Fragmentes wirksam inhibiert werden könnte. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden zunächst durch proteolytische Spaltung des mAk 2c die Antikörper Fragmente 2c-F(ab')₂ und 2c-Fab hergestellt und zur Homogenität aufgereinigt (3.1). Desweiteren wurden für die Generierung eines monovalenten Antikörperfragmentes im scFv-Format und für die geplante Humanisierung des mAk 2c die authentischen Sequenzen der variablen Domänen V_H und V_L bestimmt. Nach Klonierung dieser Sequenzen in den eukaryontischen Expressionsvektor pEE12 konnte das 2c-scFv-Fragment als kleinstmögliche antigenbindende Untereinheit des parentalen mAk 2c serumfrei in der Zellkultur exprimiert und anschließend aus dem Zellkulturüberstand aufgereinigt werden (3.1.3.3.). Überraschenderweise konnten durch die monovalenten Antikörperfragmente 2c-Fab- bzw. 2c-scFv weder eine wirksame

Neutralisation von freien Herpes Simplex Viren (3.2.3) noch eine signifikante Inhibition der direkten Virusausbreitung über den „cell-to-cell spread“ erreicht werden (3.2.5). Im Gegensatz dazu führte der Einsatz der bivalenten Antikörper mAk 2c-IgG bzw. 2c-F(ab')₂ zu einer im Vergleich mit monovalenten Fragmenten mehr als 350-fach effektiveren Neutralisation freier Herpes Simplex Viren und zu einer äußerst effizienten Inhibition des „cell-to-cell spreads“. Die Bestimmung der funktionellen Affinitäten aller generierten Antikörper schloss einen möglichen Zusammenhang zwischen der ineffizienten Virusneutralisation durch die monovalenten Antikörperfragmente und einer ungenügenden Antigenbindung aus. Erwartungsgemäß zeichneten sich die bivalenten Antikörper mAk 2c-IgG, 2c-F(ab')₂ durch eine höhere funktionelle Affinität (Avidität) im Vergleich zu den monovalenten Fragmente 2c-Fab und 2c-scFv aus (3.2.2) (112). Die funktionelle Affinität des mAk 2c-IgG und des 2c-F(ab')₂ lag mit $K_D = 10$ nM bzw. $K_D = 7$ nM im selben Bereich wie die des ebenfalls HSV-gB-spezifischen, neutralisierenden Antikörpers Fd79 (9,1 nM) (42). Durch die monovalente Antigenbindung wiesen die Fragmente 2c-Fab und 2c-scFv mit $K_D = 17$ bzw. $K_D = 19$ eine um den Faktor 2 reduzierte Affinität auf. Der geringe Unterschied der funktionellen Affinitäten lieferte allerdings keine ausreichende Erklärung für den erheblichen Unterschied in der antiviralen Wirksamkeit zwischen bivalenten und monovalenten Antikörpern. Der Einfluss der Antikörpervalenz auf die funktionellen Eigenschaften neutralisierender Antikörper konnte bereits in früheren Arbeiten beobachtet werden. So konnte beispielsweise HIV-1 durch die bivalenten Antikörper F105-IgG bzw. F105-F(ab')₂ 4-10-fach effektiver neutralisiert werden als durch das entsprechende monovalente F105 Fab-Fragment (32). Auch das Sindbis-Virus, das Japanische Enzephalitis Virus oder das Varizella-Zoster-Virus konnten durch bivalente Antikörper mit einer im Vergleich zu deren monovalenten Derivaten deutlich höheren Effizienz neutralisiert werden (56, 76, 203). Durch Kreuzvernetzung von monovalenten Fab-Fragmenten mit Hilfe von nichtneutralisierenden Sekundärantikörpern lässt sich die Neutralisationseffizienz eines gegen das Sindbis-Virus gerichteten Antikörpers teilweise wiederherstellen (203). In der vorliegenden Arbeit konnte durch Kreuzvernetzung monovalenter 2c-Fab-Fragmente mit Hilfe eines gegen die murinen Fab-Fragmente gerichteten IgG die Neutralisationseffizienz deutlich gesteigert, jedoch im Vergleich zu dem mAk 2c-IgG nicht vollständig wiederhergestellt werden (3.2.3). Unterstützt durch die Ergebnisse der Affinitätsbestimmung lässt sich vermuten, dass die antivirale Wirkung des mAk 2c mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Kreuzvernetzung des HSV-gB-Antigens zurückzuführen ist. Ein Zusammenhang zwischen der Molekulargröße der eingesetzten Antikörper und dadurch bedingten sterischen Hemmung der Fusionsaktivität des

gB kann jedoch als Ursache für die unterschiedliche Wirksamkeit von monovalenten und bivalenten 2c-Derivaten nicht völlig ausgeschlossen werden (56). Dennoch erscheint ein solcher Zusammenhang unwahrscheinlich, da die im Vergleich zum parentalen Antikörper kleineren 2c-F(ab')₂-Fragmente eine effizientere Virusneutralisation induzieren konnten als die vollständigen Antikörper im IgG-Format (3.2.3). Ebenso ist die Inhibition der Konformationsänderung des gB während der Fusion oder die Hemmung der essentiellen Wechselwirkungen zwischen den Viralen Proteinen gD, gB und dem Komplex gH/gL oder auch die Behinderung der Integration der gB-Fusionsschleifen in die Zytoplasmamembran durch mAk 2c und dessen Derivate nicht auszuschließen (7, 8, 40, 199). Die Aufklärung des Fusionsprozesses ist Gegenstand aktueller Forschung. Untersuchungen der Kristallstrukturen von Proteinkomplexen zwischen mAk 2c-Derivaten (mAk 2c-IgG, 2c-F(ab')₂ und 2c-Fab) und dem Glykoprotein B könnten entscheidende Hinweise zur Klärung der Präfusions-Konformation von gB liefern und dadurch zum besseren Verständnis des Fusionsprozesses beitragen.

4.2. Chimärisierung und Humanisierung des murinen Antikörpers mAk 2c

Der klinische Einsatz von Immunglobulinen zur Prophylaxe und Immuntherapie von Infektionskrankheiten hat in den vergangenen 30 Jahren stetig zugenommen. Derzeit befindet sich bereits eine Vielzahl von Hyperimmunglobulin-Präparaten zur Behandlung von CMV, RSV, HAV, HBV, VZV, WNV und Tollwut in der klinischen Anwendung (30, 113, 140). Die Effizienz von polyklonalen Immunglobulin-Präparaten bleibt jedoch durch den überwiegenden Anteil an Virus-unspezifischen, nicht-neutralisierenden Antikörpern limitiert. Zur Prophylaxe von HSV-Infektionen konnte dagegen noch kein wirksames Hyperimmunglobulin-Präparat hergestellt werden, da humane Antikörper nicht bzw. nur im Geringen Umfang die Virusausbreitung über den „cell-to-cell spread“ inhibieren können. Die Entdeckung wichtiger molekularbiologischer Methoden führten zur Weiterentwicklungen rekombinanter Antikörpertechnologien und ermöglichten die Generierung von monoklonalen humanisierten Antikörpern mit einem enormen prophylaktischen und therapeutischen Potential (140). Zur klinischen Nutzbarmachung des murinen monoklonalen Antikörpers mAk 2c wurde dessen immunogenes Potential gegenüber dem Menschen durch „Chimärisierung“ bzw. „Humanisierung“ auf ein Minimum reduziert (3.3). Der chimäre Antikörper mAk ch2c wurde durch Fusionierung der murinen V_H- und V_L-Gene von mAk 2c mit Genen humaner konstanter Antikörperregionen generiert. Durch eine solche Chimärisierung wird die Immunogenität eines Antikörpers um 66% herabgesetzt (22, 151).

Zur weiteren Reduktion des immunogenen Potentials wurden die Gensequenzen der für die sechs Antigenbindungsschleifen kodierenden Genabschnitte des mAk 2c (2cV_L-CDR1/2/3 und 2cV_H-CDR1/2/3) in jeweils geeignete humane „Framework“-Immunglobulin-Akzeptorgerüste aus Immunglobulin Keimbahngen des Menschen genetisch „transplantiert“ (3.2). Auf diese Weise konnte die Immunogenität des ursprünglichen murinen Antikörpers um 95% reduziert werden (136). Die Problematik eines Humanisierungs-Verfahrens stellt jedoch die oft beobachtete erheblich reduzierte antigenbindende Aktivität der humanisierten Antikörper dar und limitiert dadurch ihren klinischen Einsatz (105, 123). Die Hauptursache für einen solchen Verlust der funktionellen Affinität sind potentiell kritische Aminosäuren („key residues“) innerhalb der kanonischen Hauptkettenkonformation der für die Humanisierung ausgewählten humanen Akzeptorsequenzen (37, 38). Unterscheiden sich diese Aminosäuren der humanen Sequenz von der murinen Sequenz grundlegend in deren Größe oder Molekularladung, kann die Faltung der Antigenbindungsschleifen und dadurch auch die Funktionalität des humanisierten Antikörpers maßgeblich beeinträchtigt werden. Mit Hilfe gezielter Mutagenisierung dieser kritischen Positionen zurück zur Maussequenz kann für den humanisierten Antikörper eine zum murinen Antikörper vergleichbare Affinität wieder hergestellt werden (123, 169, 170). Durch computergestützte Analysen konnten kritische Aminosäuren innerhalb der V_H- und V_L-Sequenzen des humanisierten Antikörpers mAk hu2c identifiziert werden. Auf Grundlage dieser Daten wurden insgesamt vier humanisierte mAk 2c-Varianten (mAk hu2c V1-V4) mit sukzessiven Rückmutationen in den Framework-Regionen zur jeweiligen murinen Sequenz hergestellt und gemeinsam mit dem chimären Antikörper hinsichtlich der biophysikalischen und funktionellen Eigenschaften charakterisiert. Die spezifischen Antigenbindungseigenschaften der generierten Antikörper wurden im Vergleich zum parentalen mAk 2c mittels Kompetitionsstudien untersucht (123). Es zeigte sich, dass mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4 mit dem parentalen mAk 2c um die Antigenbindestelle konkurrieren und somit die gleiche Antigenspezifität aufweisen (3.4.2). Trotz vollständigem Erhalt der Antigenspezifität kann es jedoch im Zuge einer Humanisierung zur signifikanten Reduktion der Antigen-Affinität kommen (105). Beispielsweise wies ein ebenfalls mittels „CDR-Grafting“ humanisierter gB-spezifischer Antikörper (Fd79) eine um die Hälfte reduzierte funktionelle Affinität auf (42). Im Gegensatz dazu gelang es im Fall der Humanisierung des mAk 2c in dieser Arbeit, durch eingehenden Abgleich der Gensequenzen humaner Akzeptorgerüste aus der Keimbahn mit den murinen Donorsequenzen, die funktionelle Affinität des Antikörpers vollständig zu erhalten. Bereits die durch alleiniges „CDR-Grafting“ generierte humanisierte Variante mAk

hu2c V1 ($K_D = 12,5$ nM) zeichnete sich durch eine mit dem chimärisierten Antikörper mAk ch2c ($K_D = 10,6$ nM) als auch dem parentalen mAk 2c ($K_D = 10$ nM) vergleichbare Affinität aus. Durch das Einfügen sukzessiver Rückmutationen konnte keine weitere Verbesserung der funktionellen Affinität des Antikörpers erreicht werden. Überraschenderweise führte das Einfügen der Mutation N76K in die Framework-Region der schweren Kette bei der Variante mAk hu2c V2 sogar zu einer Reduktion der funktionellen Affinität ($K_D = 20,5$ nM). Durch das Einfügen weiterer Rückmutationen konnte bei den Varianten mAk hu2c V3 und mAk hu2c V4 eine dem parentalen mAk 2c vergleichbare Affinität wieder hergestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die mittels computergestützter Datenbankanalyse durchgeführte Selektion humaner Framework-Akzeptorsequenzen mit hoher Sequenzhomologie zur murinen Donorsequenz zur vollständigen Erhaltung der funktionellen Affinität des parentalen Antikörpers führte und keine weiteren Rückmutationen erforderte.

Neben den Antigenbindungseigenschaften konnten auch die funktionellen Eigenschaften des parentalen Antikörpers vollständig beibehalten werden. Der chimäre Antikörper sowie die humanisierten Varianten zeigten eine zum parentalen mAk 2c gleichermaßen effiziente Virusneutralisation (3.4.3). Eine Ausnahme stellte auch hier wieder die Variante mAk hu2c V2 mit einer Rückmutation dar. Überraschenderweise war auch die Neutralisationseffizienz bei dieser Variante um 50% vermindert. Eine vergleichbare Korrelation zwischen Affinität und Wirksamkeit wurde auch im Zuge eines Humanisierungsprojektes des gegen das West Nil Virus gerichteten Antikörpers E16 beobachtet werden (158). In diesem Fall konnte durch das Einfügen von drei Rückmutationen die Affinität des humanisierten Antikörpers Hm-E16 optimiert und dadurch die Neutralisationseffizienz gesteigert werden.

Zur weiteren präklinischen Evaluierung wurde mAk hu2c V1 ausgewählt, da diese humanisierte Variante zum einen durch das Fehlen von Rückmutationen in den Framework-Regionen zur murinen Donorsequenz das geringste immunogen Potenzial haben sollte und zum anderen sich durch die gleichen funktionellen Eigenschaften wie der parentale mAk 2c (Affinität, Neutralisationseffizienz) sowie der Fähigkeit zur wirkungsvollen Inhibition des „cell-to-cell spreads“ auszeichnet (3.4.5). Die Untersuchungen des Neutralisationspotentials an einem breiten Kollektiv von klinischen HSV-1/HSV-2 Isolaten sowie Laborstämmen zeigten, dass mAk hu2c V1 zur gleichermaßen wirksamen Neutralisation von Virusstämmen ohne bzw. mit nachgewiesener Virustatika-Resistenz in der Lage ist (3.5). Diese Eigenschaft macht mAk hu2c V1 zu einem Vielversprechenden Kandidaten für die Weiterentwicklung als einsatzfähiges Reagenz zur Immunprophylaxe und Therapie von Reaktivierungen resistenter HSV-Stämme.

Die Virusneutralisation durch humane antivirale Antikörper wird hauptsächlich durch eine Aktivierung der Komplementkaskade (58) sowie der Aktivierung von Immuneffektorzellen (166) verstärkt. Für die Rekrutierung dieser natürlichen Effektorfunktionen ist die IgG-Fc-Domäne des Antikörpers verantwortlich. Jedoch haben Herpes Simplex Viren im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, um einer Immunantwort des Menschen zu entgehen. Das Glykoprotein C beispielsweise kann durch Bindung an das Komplement-Protein C3b das Virus vor einer Komplement-vermittelten Neutralisation schützen (73, 121). Einen weiteren Mechanismus der herpesviralen Immunevasion stellt die Bindung der IgG-Fc-Domäne durch den viralen Proteinkomplex gE/gI dar (138, 153). Binden IgGs spezifisch an virale Antigene, wird durch eine gleichzeitige Interaktion ihrer IgG-Fc-Domäne mit dem sogenannten HSV-Fc-Rezeptor eine Aktivierung von Effektorfunktionen unterbunden (191). Die Interaktion zwischen dem HSV-Fc-Rezeptor und der IgG-Fc-Domäne ist speziesspezifisch und von der Immunglobulin Subklasse ($\text{IgG4} > \text{IgG1} \geq \text{IgG2}$) abhängig (100-102). Im Gegensatz zu murinen Antikörpern, wie dem mAk 2c, können humane Antikörper und auch der humanisierte Antikörper mAk hu2c V1, welcher der Subklasse IgG1 angehört, durch den HSV-Fc-Rezeptor gebunden werden (101). Die Kompetitionsstudien zwischen mAk 2c und den rekombinanten Antikörpern lieferten bereits Hinweise auf eine solche Interaktion (3.4.2). Daher sollte im Zuge weiterer Experimente der Einfluss der Aktivierung von Effektorfunktionen auf die antivirale Wirksamkeit des mAk hu2c V1 überprüft werden. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit als Kontrolle verwendeten Immunseren oder Immunglobulin-Präparaten, zeigten die experimentellen Untersuchungen jedoch, dass sowohl der murine als auch der humanisierte monoklonale Antikörper zur vollständig Komplement-unabhängigen Virusneutralisation in der Lage sind (3.4.6). Dies stellt einen enormen Vorteil des mAk hu2c V1 gegenüber humanen Serum-Antikörpern dar, deren antivirale Wirksamkeit maßgeblich durch die gE/gI-induzierte Immunevasion beeinträchtigt wird.

Neben der Aktivierung von Komplementfunktionen können Immuneffektorzellen die Wirksamkeit von neutralisierenden, HSV-spezifischen Antikörpern signifikant verstärken. Eine Evaluation neutralisierender Mausantikörper mit der Antigenspezifität gegenüber den Proteinen gD und gB im Mausmodell zeigte einen kausalen Zusammenhang zwischen der antiviralen Wirksamkeit dieser Antikörper und der Aktivierung der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) (82, 118, 119). Die hier durchgeführten in vitro Untersuchungen zur Aktivierung von Effektorzellen mittels eines Reporter-Assays zeigten, dass mAk 2c durch Bindung an den murinen Fc-Rezeptor mCD16 und mAk hu2c V1 durch

Bindung an die humanen Fcγ-Rezeptoren CD16 und CD64 murine bzw. humane NK-Zellen und myeloische Zellen prinzipiell aktivieren können (3.4.7). Die Experimente zeigten jedoch auch, dass eine Aktivierung durch den humanisierten Antikörper über den CD16 Rezeptor bei Vorhandensein eines funktionellen HSV-Fc-Rezeptors gravierend gehemmt wird. Durch diesen Effekt kann die antikörpervermittelte Zelllyse und damit auch die Effektivität eines Antikörpers, deren Wirksamkeit maßgeblich auf der Aktivierung von Effektorzellen beruht, hochgradig eingeschränkt werden (57). Die Auswirkungen dieser Inhibition der Zelllyse auf einen therapeutischen Einsatz des humanisierten Antikörpers mAk hu2c V1 konnten jedoch auf Grundlage des *in vitro* Ergebnisse nicht abgeschätzt werden. Daher sollte die Wirksamkeit des mAk hu2c V1 auch im Mausmodell untersucht werden.

4.3. Funktionelle Charakterisierung von mAk ch2c und mAk hu2c V1 *in vivo*

Die Reaktivierungen von HSV-Infektionen bei Patienten mit starker Immunsuppression und eine Zunahme resistenter Virusstämme in dieser Patientengruppe, sind häufig mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert (47). Eine Alternative zur herkömmlichen Virusstatika stellen rekombinant hergestellte Antikörper dar. Das therapeutische Potential solcher Antikörper mit der Spezifität gegenüber den Proteinen gD und gB konnte bereits durch Hemmung einer vaginalen Infektion mit dem Laborstamm HSV-2 G eindrucksvoll im Mausmodell demonstriert werden (215-217). In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Wirksamkeit des gB-spezifischen humanisierten mAk hu2c V1 im Mausmodell präklinisch evaluiert werden.

Im Hinblick auf das spätere klinische Anwendungsgebiet des humanisierten mAk hu2c V1 wurde zur präklinischen Evaluation ein Tiermodell mit hochgradig immundefizienten Mäusen (NOD/SCID) gewählt (1.2.6), da der HSV-Infektionsverlauf bei diesen Mäusen demjenigen bei Patienten mit starker Immunsuppression ähnelt. Zur Infektion wurde, analog publizierter Tierversuche mit immunkompetenten als auch T-Zell-depletierten (CD4⁻/CD8⁻) Mäusen (60, 61), die Vaginalschleimhaut der Tiere mit einer letalen HSV-Dosis inokuliert. Ohne Behandlung kommt es bei den Tieren zu einer neuronalen, disseminierten Ausbreitung des Virus über das zentrale Nervensystem bis hin zum Gehirn, die mit einer Paralyse der Hinterbeine und der Ausbildung einer letalen Enzephalitis assoziiert ist, die auch bei den hier eingesetzten NOD/SCID Mäusen innerhalb von 9-13 Tagen zum Tod führt. Sowohl die passive Immunisierung als auch die Mehrfachgabe neutralisierender, gB-, gC-, bzw. gD-spezifischer Mausantikörper nach erfolgter Virusexposition vermittelt einen Schutz gegenüber einer letalen Infektion (54, 60). Im Gegensatz zu murinen Antikörpern kann die Behandlung

von Versuchstieren mit einer T-Zell-Depletion und von SCID-Mäusen (T-Zell- und B-Zell-Defekt) mit einem humanen Hyperimmunglobulinpräparat zwar das Überleben der Tiere um wenige Tage verlängern, jedoch keinen wirksamen Schutz vermitteln (61, 146, 152). Die Ergebnisse früherer Studien zeigen jedoch auch, dass die alleinige Gabe neutralisierender muriner Antikörper bei immundefekten Versuchstieren mit einer zusätzlichen NK-Zell-Depletion keinen ausreichenden Schutz vor einem tödlichen Ausgang der HSV-Infektion vermitteln (118, 119). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der antiviralen Wirksamkeit im NOD/SCID-Mausmodell zeigten erstmals, dass die alleinige Gabe des Antikörpers mAk hu2c V1 zur wirksamen Neutralisation einer HSV-Infektion in der Lage ist. Sowohl eine passive Immunisierung der Versuchstiere als auch die postexpositions-prophylaktische Gabe des Antikörpers inhibierte die Virusvermehrung in der Vaginal-Schleimhaut innerhalb kurzer Zeit und führte zur hocheffizienten Hemmung einer generalisierten, letal verlaufenden Erkrankung (3.6.1.3 und 3.6.2). Der humanisierte Antikörper zeigte in dem präklinischen Tiermodell wie auch in den in vitro Zellkulturuntersuchungen die gleiche Effizienz wie der parentale murine Antikörper. Darüberhinaus spricht der fehlende Nachweis von infektiösem Virus in den Organen erfolgreich behandelter Versuchstiere spricht für eine erfolgreiche Inhibition des „cell-to-cell spreads“ durch mAk hu2c V1.

Die zunehmende Entwicklung multiresistenter Virusstämme bei Patienten mit Immunsuppression führt in der Klinik mangels wirksamer alternativer Virusstatika zu schwerwiegenden Komplikationen (11, 12). Der humanisierte Antikörper stellt in solchen Fällen eine alternative Therapieoption dar. Daher wurde zur Untersuchung der Fähigkeit zur Neutralisation solcher Virusstämme durch mAk hu2c V1 von dem klinischen, gegenüber den Virustatika Aciclovir (ACV), Foscarnet (PFA) und Cidofovir (CDV) multiresistenten Isolat der Virusstock HSV-1 R10.2 in der Zellkultur hergestellt und im Tiermodell eingesetzt. Die derzeitige Standardtherapie bei lokalen und disseminierten HSV-Infektionen ist ACV. Es konnte auch gezeigt werden das ACV zur effektiven Neutralisation von Herpesviren im Mausmodell in der Lage ist (62, 159). In dem hier untersuchten Mausmodell konnte die ACV-Therapie zwar das Überleben der Tiere im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe verlängern, jedoch aufgrund der extrem verringerten Sensitivität von HSV-1 R10.2 gegenüber ACV, den letalen Ausgang nicht verhindern. Die postexpositionelle Immunprophylaxe mit dem humanisierten Antikörper konnte dahingegen den letalen Verlauf der HSV-1-R10.2-Infektion wirksam inhibieren und die infizierten Versuchstiere vollständig schützen. Aufgrund der in Rahmen dieser Arbeit gezeigten außerordentlich effizienten Virusneutralisation sowohl

gegenüber Laborstämmen als auch gegenüber resistenten Virusstämmen stellt der mAk hu2c V1 eine wirkungsvolle Alternative zur Prophylaxe und Therapie von resistenten HSV-Infektionen.

4.4. Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erfolgreich ein humanisierter anti-HSV-Antikörper generiert werden und somit der Grundstein für eine klinische Entwicklung dieses Antikörpers als Virustatikum-Alternative zur Prävention und Therapie von schweren Herpes Simplex Virus Infektionen gelegt werden. Die Untersuchungen in immundefizienten Mäusen zeigten erstmals, dass ein monoklonaler Antikörper mit dieser Spezifität ohne Aktivierung von Effektorzellen zur wirksamen Virusneutralisation in der Lage ist und einen wirksamen Schutz vor einer tödlichen HSV-Infektion vermitteln kann. Diese Ergebnisse belegen das klinische Potenzial des humanisierten Antikörpers.

Die meisten derzeit in einer klinischen Anwendung befindlichen Antikörper gehören der Subklasse IgG1 an. Durch den bereits langjährigen klinischen Einsatz dieser Antikörper-Subklasse ist jedoch auch bekannt, dass die antikörpervermittelte Aktivierung von Effektorfunktionen durch IgG1-Antikörper mit unerwünschten Nebenwirkungen assoziiert sein kann (128, 155). Da der mAk hu2c V1 ohne die Unterstützung von Komplement und Effektorzellen zur wirksamen Neutralisation in der Lage ist, lässt sich die Wahrscheinlichkeit der mit der IgG1-Klasse assoziierten Nebenwirkungen durch Reformatierung des Antikörpers in IgG4-Klasse Antikörper reduzieren. Die IgG4-Subklasse bringt jedoch für den therapeutischen Einsatz des hier entwickelten humanisierten Antikörpers zwei entscheidende Nachteile mit sich, die sich jedoch durch entsprechende gentechnische Modifikationen beheben lassen sollten. Erst kürzlich wurde bei der IgG4-Klasse ein sogenannter Fab-Arm-Austausch beschrieben, der zur Ausbildung eines bifunktionellen Antikörpers, dessen „Fab-Arme“ ein jeweils unterschiedliches Antigen erkennen, führt (175, 179, 205). Für die Wirksamkeit des mAk hu2c V1 ist jedoch die Bivalenz entscheidend. Durch eine stabilisierende Modifikation kann die „Hinge-Region“ der IgG4-Subklasse (Cys-Pro-Ser-Cys) durch Aminosäureaustausch zur IgG1-Subklasse (Cys-Pro-Pro-Cys) überführt und damit die Bivalenz erhalten werden (129, 179).

Einen weiteren Nachteil stellt die hohe Affinität der IgG4-Fc-Domäne gegenüber dem HSV-Fc-Rezeptor dar. Diese Wechselwirkung stellt einen Immunevasions-Mechanismus dar. Antikörper können nach Bindung an den HSV-Fc-Rezeptor in das Innere einer infizierten Zelle internalisiert und sauren Milieu an Lysosomen degradiert werden (191). Für den humanisierten Antikörper würde das eine Verminderung seiner Wirksamkeit bedeuten. Durch gezielte Mutagenese der Position His435 kann diese Art der herpesviralen Immunevasion neutralisiert werden (191). Auf diesen Erkenntnissen aufbauend kann die Reformatierung und weitere präklinische Evaluierung des mAk hu2c V1 als innovatives Konzept zur Prävention

und Therapie von Herpes Simplex Reaktivierungen bei immunkomprimierten Patienten vorangetrieben werden.

Eine weitere Perspektive stellt die Entwicklung eines Impfstoffes auf Grundlage des durch mAk 2c erkannten Epitopes mittels reverser Vakzinierung dar. Das Ziel einer solchen Impfstoffentwicklung ist die Induktion von Antikörpern mit den Eigenschaften des mAk 2c im Zuge einer humoralen Immunantwort.

5. Zusammenfassung

5.1. Zusammenfassung auf Deutsch

Herpes Simplex Viren sind weltweit verbreitet und gehören zu den häufigsten viralen Infektionserregern. Reaktivierungen dieser lebenslang im Wirtsorganismus persistierenden Viren sind insbesondere bei Patienten mit einer schweren Immunsuppression mit lebensbedrohlichen Komplikationen assoziiert. Der dadurch notwendige häufige und langandauernde Einsatz etablierter Virustatika führt zu einer zunehmenden Ausbildung resistenter Virusstämme, die eine rasch fortschreitende, generalisierte Infektion mit tödlichem Verlauf zur Folge haben können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der gegenüber HSV-1 und HSV-2 hochwirksame murine monoklonale Antikörper mAk 2c für eine spätere Anwendung beim Menschen präklinisch evaluiert. Die Untersuchungen der funktionellen Eigenschaften der Antikörperfragmente 2c-F(ab')₂, 2c-Fab und 2c-scFv im direkten Vergleich zum parentalen mAk 2c zeigten, dass die Antikörpervalenz für die antivirale Wirksamkeit des Antikörpers von entscheidender Bedeutung war. Die bivalenten Antikörper mAk 2c und 2c-F(ab')₂ zeichneten sich im Gegensatz zu den monovalenten Antikörper-Fragmenten 2c-Fab und 2c-scFv durch eine extrem effiziente Virusneutralisation aus und konnten den „cell-to-cell spread“ wirksam inhibieren. Im Gegensatz zur Maus werden beim Mensch Antikörper mit dieser Spezifität nicht gebildet. Da murine Antikörper für den Menschen immunogen sind, wurde die Immunogenität des mAk 2c durch Humanisierung nahezu vollständig eliminiert. Die funktionellen Eigenschaften des parentalen mAk 2c konnten dabei vollständig erhalten werden. Bereits die durch alleiniges CDR-Grafting generierte humanisierte Variante mAk hu2c V1 wies eine zum mAk 2c vergleichbare Affinität auf und war zur gleichermaßen effizienten Virusneutralisation sowie Inhibition des „cell-to-cell spreads“ in der Lage. Darüberhinaus konnte die antivirale Wirksamkeit des mAk hu2c V1 an einem breiten Kollektiv von klinischen HSV-1/HSV-2 Isolaten ohne oder mit nachgewiesener Virustatika-Resistenz sowie Laborstämmen demonstriert werden. Sämtliche der untersuchten Isolate wurden durch den humanisierten Antikörper mit derselben Effektivität neutralisiert wie die Laborstämme des entsprechenden Typs. Die Untersuchung des Neutralisationspotentials des mAk hu2c V1 im NOD/SCID-Mausmodell zeigte erstmals, dass die alleinige Antikörpergabe ohne zusätzliche Aktivierung von Immun-Effektorfunktionen einen wirksamen Schutz vor einer sonst tödlich verlaufenden Infektion vermittelt. Abschließend wurde die Fähigkeit des mAk hu2c V1 zur Neutralisation des gegenüber etablierten Virustatika multiresistenten

Isolates HSV-1 R10.2 im Tiermodell untersucht. Die Gabe des humanisierten Antikörpers im Zuge einer postexpositionellen Immunprophylaxe führte im Gegensatz zur Behandlung mit Aciclovir zu einer wirksamen Eliminierung der Infektion und zum vollständigen Schutz der immunsupprimierten Versuchstiere vor einem letalen Infektionsverlauf. Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich durchgeführte Humanisierung des anti-HSV-Antikörpers stellt eine vielversprechende Grundlage für die klinische Weiterentwicklung dieses Antikörpers als eine äußerst wirksame Virustatikum-Alternative zur Prophylaxe und Therapie von Herpes Simplex Infektionen dar.

5.2. Zusammenfassung auf Englisch / summary

Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) are widely spread viruses in adults. After primary lytic infection, HSV establishes a lifelong latent infection followed by periodical recurrence. Aciclovir (ACV), Foscarnet and Cidofovir are the drugs of choice for the treatment of acute HSV infections. However, in immunocompromized individuals like HIV/AIDS patients or transplant recipients, increasing occurrence of ACV- and multiresistant HSV is associated with severe life-threatening infections. Human anti-HSV-antibodies generated after primary infection are essential for the establishment of the latent infection, but do not inhibit the virus proliferation or the HSV-typical cell-to-cell spread. Thus, development of novel drugs for overcoming HSV drug resistance is of great importance.

In the current work, the murine monoclonal antibody mAb 2c, which proved to be extremely effective in suppression of HSV infections in mice, was evaluated as a novel compound to overcome resistant HSV-infections. Furthermore, it could be demonstrated that antibody valency has a major effect on antiviral efficiency. The bivalent antibodies mAb 2c and F(ab)₂ fragments were extremely efficacious in clearance of free virus and inhibition of the cell-to-cell spread, while monovalent 2c-Fab and 2c-scFv fragments induced a 300 fold lower neutralization and were not capable to block viral cell-to-cell spread. Major impediment to the clinical utility of murine antibodies is their potential to elicit human anti-murine antibody response in patients. Thus, the immunogenic potential of mAb 2c was eliminated by a new humanization approach. The creation of the humanized mAb hu2c V1 was accomplished by inserting the appropriate CDR coding segments, responsible for the desired binding properties, into a human antibody "scaffold". The affinity, the virus neutralization and the cell-to-cell spread inhibition results showed that the humanized antibody mAb hu2c V1 retained the biological properties of the parental murine monoclonal antibody. Furthermore, mAb hu2c V1 showed extraordinary neutralization efficiency towards ACV- and multiresistant HSV-1 and HSV-2 strains in vitro. Finally, it could be shown that mAb hu2c V1 was capable to eliminate virus from the vaginal mucosa and to prevent severe immunodeficient NOD/SCID mice from a lethal outcome of HSV-infection. In contrast to ACV, the humanized antibody efficiently neutralized the multiresistant (ACV, PFA, CDV) HSV-1 R-10.2 strain in NOD/SCID mice. Thus, the obtained data hold great promise for the further development of mAb hu2c V1 as an alternative drug for HSV therapy.

6. Literaturverzeichnis

1. **Abaitua, F., R. N. Souto, H. Browne, T. Daikoku, and P. O'Hare.** 2009. Characterization of the herpes simplex virus (HSV)-1 tegument protein VP1-2 during infection with the HSV temperature-sensitive mutant tsB7. *J Gen Virol* **90**:2353-63.
2. **Adler, S. P., and G. Nigro.** 2009. Findings and conclusions from CMV hyperimmune globulin treatment trials. *J Clin Virol* **46 Suppl 4**:S54-7.
3. **Akhtar, J., and D. Shukla.** 2009. Viral entry mechanisms: cellular and viral mediators of herpes simplex virus entry. *FEBS J* **276**:7228-36.
4. **Anuras, S., and R. Summers.** 1976. Fulminant herpes simplex hepatitis in an adult: report of a case in renal transplant recipient. *Gastroenterology* **70**:425-8.
5. **Arndt, M. A., J. Krauss, and S. M. Rybak.** 2004. Antigen binding and stability properties of non-covalently linked anti-CD22 single-chain Fv dimers. *FEBS Lett* **578**:257-61.
6. **Arndt, M. A., J. Krauss, R. Schwarzenbacher, B. K. Vu, S. Greene, and S. M. Rybak.** 2003. Generation of a highly stable, internalizing anti-CD22 single-chain Fv fragment for targeting non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* **107**:822-9.
7. **Atanasiu, D., J. C. Whitbeck, T. M. Cairns, B. Reilly, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 2007. Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:18718-23.
8. **Atanasiu, D., J. C. Whitbeck, M. P. de Leon, H. Lou, B. P. Hannah, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 2010. Bimolecular complementation defines functional regions of Herpes simplex virus gB that are involved with gH/gL as a necessary step leading to cell fusion. *J Virol* **84**:3825-34.
9. **Azimzadeh, A., and M. H. Van Regenmortel.** 1990. Antibody affinity measurements. *J Mol Recognit* **3**:108-16.
10. **Baca, M., L. G. Presta, S. J. O'Connor, and J. A. Wells.** 1997. Antibody humanization using monovalent phage display. *J Biol Chem* **272**:10678-84.
11. **Bacon, T. H., R. J. Boon, M. Schultz, and C. Hodges-Savola.** 2002. Surveillance for antiviral-agent-resistant herpes simplex virus in the general population with recurrent herpes labialis. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3042-4.
12. **Bacon, T. H., M. J. Levin, J. J. Leary, R. T. Sarisky, and D. Sutton.** 2003. Herpes simplex virus resistance to acyclovir and penciclovir after two decades of antiviral therapy. *Clin Microbiol Rev* **16**:114-28.
13. **Barnes, L. M., C. M. Bentley, and A. J. Dickson.** 2000. Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system. *Cytotechnology* **32**:109-23.
14. **Becker, Y., H. Dym, and I. Sarov.** 1968. Herpes simplex virus DNA. *Virology* **36**:184-92.
15. **Bender, F. C., M. Samanta, E. E. Heldwein, M. P. de Leon, E. Bilman, H. Lou, J. C. Whitbeck, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen.** 2007. Antigenic and mutational analyses of herpes simplex virus glycoprotein B reveal four functional regions. *J Virol* **81**:3827-41.
16. **Bender, F. C., J. C. Whitbeck, H. Lou, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 2005. Herpes simplex virus glycoprotein B binds to cell surfaces independently of heparan sulfate and blocks virus entry. *J Virol* **79**:11588-97.

17. **Benedict, C. A., A. J. MacKrell, and W. F. Anderson.** 1997. Determination of the binding affinity of an anti-CD34 single-chain antibody using a novel, flow cytometry based assay. *J Immunol Methods* **201**:223-31.
18. **Bizebard, T., B. Gigant, P. Rigolet, B. Rasmussen, O. Diat, P. Bosecke, S. A. Wharton, J. J. Skehel, and M. Knossow.** 1995. Structure of influenza virus haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody. *Nature* **376**:92-4.
19. **Bloom, D. C.** 2004. HSV LAT and neuronal survival. *Int Rev Immunol* **23**:187-98.
20. **Boon, R. J., T. H. Bacon, H. L. Robey, T. J. Coleman, A. Connolly, P. Crosson, and S. L. Sacks.** 2000. Antiviral susceptibilities of herpes simplex virus from immunocompetent subjects with recurrent herpes labialis: a UK-based survey. *J Antimicrob Chemother* **46**:1051.
21. **Boruchov, A. M., G. Heller, M. C. Veri, E. Bonvini, J. V. Ravetch, and J. W. Young.** 2005. Activating and inhibitory IgG Fc receptors on human DCs mediate opposing functions. *J Clin Invest* **115**:2914-23.
22. **Boulianne, G. L., N. Hozumi, and M. J. Shulman.** 1984. Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* **312**:643-6.
23. **Brown, S. M., D. A. Ritchie, and J. H. Subak-Sharpe.** 1973. Genetic studies with herpes simplex virus type 1. The isolation of temperature-sensitive mutants, their arrangement into complementation groups and recombination analysis leading to a linkage map. *J Gen Virol* **18**:329-46.
24. **Brownstein, M. J., J. D. Carpten, and J. R. Smith.** 1996. Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques* **20**:1004-6, 1008-10.
25. **Burbelo, P. D., Y. Hoshino, H. Leahy, T. Krogmann, R. L. Hornung, M. J. Iadarola, and J. I. Cohen.** 2009. Serological diagnosis of human herpes simplex virus type 1 and 2 infections by luciferase immunoprecipitation system assay. *Clin Vaccine Immunol* **16**:366-71.
26. **Burioni, R., R. A. Williamson, P. P. Sanna, F. E. Bloom, and D. R. Burton.** 1994. Recombinant human Fab to glycoprotein D neutralizes infectivity and prevents cell-to-cell transmission of herpes simplex viruses 1 and 2 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:355-9.
27. **Burton, D. R., R. C. Desrosiers, R. W. Doms, W. C. Koff, P. D. Kwong, J. P. Moore, G. J. Nabel, J. Sodroski, I. A. Wilson, and R. T. Wyatt.** 2004. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* **5**:233-6.
28. **Campadelli-Fiume, G., M. Amasio, E. Avitabile, A. Cerretani, C. Forghieri, T. Gianni, and L. Menotti.** 2007. The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Rev Med Virol* **17**:313-26.
29. **Carter, C., S. Savic, J. Cole, and P. Wood.** 2007. Natural killer cell receptor expression in patients with severe and recurrent Herpes simplex virus-1 (HSV-1) infections. *Cell Immunol* **246**:65-74.
30. **Casadevall, A., E. Dadachova, and L. A. Pirofski.** 2004. Passive antibody therapy for infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* **2**:695-703.
31. **Casadevall, A., and M. D. Scharff.** 1995. Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin Infect Dis* **21**:150-61.
32. **Cavacini, L. A., C. L. Emes, J. Power, M. Duval, and M. R. Posner.** 1994. Effect of antibody valency on interaction with cell-surface expressed HIV-1 and viral neutralization. *J Immunol* **152**:2538-45.
33. **Chapsal, J. M., and L. Pereira.** 1988. Characterization of epitopes on native and denatured forms of herpes simplex virus glycoprotein B. *Virology* **164**:427-34.

34. **Cheshenko, N., and B. C. Herold.** 2002. Glycoprotein B plays a predominant role in mediating herpes simplex virus type 2 attachment and is required for entry and cell-to-cell spread. *J Gen Virol* **83**:2247-55.
35. **Chibo, D., A. Mijch, R. Doherty, and C. Birch.** 2002. Novel mutations in the thymidine kinase and DNA polymerase genes of acyclovir and foscarnet resistant herpes simplex viruses infecting an immunocompromised patient. *J Clin Virol* **25**:165-70.
36. **Chothia, C., I. Gelfand, and A. Kister.** 1998. Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain. *J Mol Biol* **278**:457-79.
37. **Chothia, C., and A. M. Lesk.** 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* **196**:901-17.
38. **Chothia, C., A. M. Lesk, A. Tramontano, M. Levitt, S. J. Smith-Gill, G. Air, S. Sheriff, E. A. Padlan, D. Davies, W. R. Tulip, and et al.** 1989. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* **342**:877-83.
39. **Chothia, C., J. Novotny, R. Bruccoleri, and M. Karplus.** 1985. Domain association in immunoglobulin molecules. The packing of variable domains. *J Mol Biol* **186**:651-63.
40. **Chowdary, T. K., T. M. Cairns, D. Atanasiu, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and E. E. Heldwein.** 2010. Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nat Struct Mol Biol* **17**:882-8.
41. **Christophers, J., J. Clayton, J. Craske, R. Ward, P. Collins, M. Trowbridge, and G. Darby.** 1998. Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:868-72.
42. **Co, M. S., M. Deschamps, R. J. Whitley, and C. Queen.** 1991. Humanized antibodies for antiviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2869-73.
43. **Coligan, J. E., B. Bierer, D. H. Margulies, E. M. Shevach, W. Strober, and R. Coico.** 2007. *Current Protocols in Immunology*. John Wiley and Sons, Inc.
44. **Collins, P., and M. N. Ellis.** 1993. Sensitivity monitoring of clinical isolates of herpes simplex virus to acyclovir. *J Med Virol Suppl* **1**:58-66.
45. **Cunningham, A. L., R. R. Turner, A. C. Miller, M. F. Para, and T. C. Merigan.** 1985. Evolution of recurrent herpes simplex lesions. An immunohistologic study. *J Clin Invest* **75**:226-33.
46. **Cunningham, B. A., M. N. Pflumm, U. Rutishauser, and G. M. Edelman.** 1969. Subgroups of amino acid sequences in the variable regions of immunoglobulin heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **64**:997-1003.
47. **Danve-Szatanek, C., M. Aymard, D. Thouvenot, F. Morfin, G. Agius, I. Bertin, S. Billaudel, B. Chanzy, M. Coste-Burel, L. Finkielsztejn, H. Fleury, T. Hadou, C. Henquell, H. Lafeuille, M. E. Lafon, A. Le Faou, M. C. Legrand, L. Maille, C. Mengelle, P. Morand, F. Morinet, E. Nicand, S. Omar, B. Picard, B. Pozzetto, J. Puel, D. Raoult, C. Scieux, M. Segondy, J. M. Seigneurin, R. Teyssou, and C. Zandotti.** 2004. Surveillance network for herpes simplex virus resistance to antiviral drugs: 3-year follow-up. *J Clin Microbiol* **42**:242-9.
48. **Darville, J. M., B. E. Ley, A. P. Roome, and A. B. Foot.** 1998. Acyclovir-resistant herpes simplex virus infections in a bone marrow transplant population. *Bone Marrow Transplant* **22**:587-9.
49. **Davison, A. J., R. Eberle, B. Ehlers, G. S. Hayward, D. J. McGeoch, A. C. Minson, P. E. Pellett, B. Roizman, M. J. Studdert, and E. Thiry.** 2009. The order Herpesvirales. *Arch Virol* **154**:171-7.
50. **De Clercq, E., J. Descamps, G. Verhelst, R. T. Walker, A. S. Jones, P. F. Torrence, and D. Shugar.** 1980. Comparative efficacy of antiherpes drugs against different strains of herpes simplex virus. *J Infect Dis* **141**:563-74.

51. **Desai, P., and S. Person.** 1998. Incorporation of the green fluorescent protein into the herpes simplex virus type 1 capsid. *J Virol* **72**:7563-8.
52. **Dhodapkar, K. M., J. Krasovsky, B. Williamson, and M. V. Dhodapkar.** 2002. Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J Exp Med* **195**:125-33.
53. **Dingwell, K. S., C. R. Brunetti, R. L. Hendricks, Q. Tang, M. Tang, A. J. Rainbow, and D. C. Johnson.** 1994. Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *J Virol* **68**:834-45.
54. **Dix, R. D., L. Pereira, and J. R. Baringer.** 1981. Use of monoclonal antibody directed against herpes simplex virus glycoproteins to protect mice against acute virus-induced neurological disease. *Infect Immun* **34**:192-9.
55. **Doerr, H. W., and W. H. Gerlich.** 2010. Medizinische Virologie, vol. 2-te Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
56. **Drew, P. D., M. T. Moss, T. J. Pasioka, C. Grose, W. J. Harris, and A. J. Porter.** 2001. Multimeric humanized varicella-zoster virus antibody fragments to gH neutralize virus while monomeric fragments do not. *J Gen Virol* **82**:1959-63.
57. **Dubin, G., E. Socolof, I. Frank, and H. M. Friedman.** 1991. Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Virol* **65**:7046-50.
58. **Duncan, A. R., and G. Winter.** 1988. The binding site for C1q on IgG. *Nature* **332**:738-40.
59. **Edelman, G. M., B. A. Cunningham, W. E. Gall, P. D. Gottlieb, U. Rutishauser, and M. J. Waxdal.** 1969. The covalent structure of an entire gammaG immunoglobulin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **63**:78-85.
60. **Eis-Hubinger, A. M., K. Mohr, and K. E. Schneweis.** 1991. Different mechanisms of protection by monoclonal and polyclonal antibodies during the course of herpes simplex virus infection. *Intervirology* **32**:351-60.
61. **Eis-Hubinger, A. M., D. S. Schmidt, and K. E. Schneweis.** 1993. Anti-glycoprotein B monoclonal antibody protects T cell-depleted mice against herpes simplex virus infection by inhibition of virus replication at the inoculated mucous membranes. *J Gen Virol* **74** (Pt 3):379-85.
62. **Eis, A. M., and K. E. Schneweis.** 1986. Pathogenesis of genital herpes simplex virus infection in mice. IV. Quantitative aspects of viral latency. *Med Microbiol Immunol* **175**:281-92.
63. **Ejercito, P. M., E. D. Kieff, and B. Roizman.** 1968. Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J Gen Virol* **2**:357-64.
64. **Elion, G. B., P. A. Furman, J. A. Fyfe, P. de Miranda, L. Beauchamp, and H. J. Schaeffer.** 1977. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5716-20.
65. **Englund, J. A., M. E. Zimmerman, E. M. Swierkosz, J. L. Goodman, D. R. Scholl, and H. H. Balfour, Jr.** 1990. Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. *Ann Intern Med* **112**:416-22.
66. **Fairbanks, G., T. L. Steck, and D. F. Wallach.** 1971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* **10**:2606-17.
67. **Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder, and P. M. Guyre.** 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* **157**:541-8.

68. **Field, H. J., and P. Wildy.** 1978. The pathogenicity of thymidine kinase-deficient mutants of herpes simplex virus in mice. *J Hyg (Lond)* **81**:267-77.
69. **Fleck, M., J. Podlech, K. Weise, H. Muntefering, and D. Falke.** 1993. Pathogenesis of HSV-1/2 induced vaginitis/vulvitis of the mouse: dependence of lesions on genetic properties of the virus and analysis of pathohistology. *Arch Virol* **129**:35-51.
70. **Fleury, D., S. A. Wharton, J. J. Skehel, M. Knossow, and T. Bizebard.** 1998. Antigen distortion allows influenza virus to escape neutralization. *Nat Struct Biol* **5**:119-23.
71. **Foster, T. P., G. V. Rybachuk, and K. G. Kousoulas.** 2001. Glycoprotein K specified by herpes simplex virus type 1 is expressed on virions as a Golgi complex-dependent glycosylated species and functions in virion entry. *J Virol* **75**:12431-8.
72. **Frantidou, F., F. Kamaria, K. Dumaidi, L. Skoura, A. Antoniadis, and A. Papa.** 2008. Aseptic meningitis and encephalitis because of herpesviruses and enteroviruses in an immunocompetent adult population. *Eur J Neurol* **15**:995-7.
73. **Friedman, H. M., G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, C. A. Seidel, and D. B. Cines.** 1984. Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* **309**:633-5.
74. **Gianni, T., M. Amasio, and G. Campadelli-Fiume.** 2009. Herpes simplex virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH/gL in part through the C-terminal profusion domain. *J Biol Chem* **284**:17370-82.
75. **Glover, D. M., and B. D. Hames.** 1995. *DNA Cloning - Mammalian Systems*, vol. 4. Oxford University Press.
76. **Goncalvez, A. P., C. H. Chien, K. Tubthong, I. Gorshkova, C. Roll, O. Donau, P. Schuck, S. Yoksan, S. D. Wang, R. H. Purcell, and C. J. Lai.** 2008. Humanized monoclonal antibodies derived from chimpanzee Fabs protect against Japanese encephalitis virus in vitro and in vivo. *J Virol* **82**:7009-21.
77. **Good, R. A., and E. Lorenz.** 1991. Historic aspects of intravenous immunoglobulin therapy. *Cancer* **68**:1415-21.
78. **Granzow, H., B. G. Klupp, W. Fuchs, J. Veits, N. Osterrieder, and T. C. Mettenleiter.** 2001. Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *J Virol* **75**:3675-84.
79. **Griffiths, P. D.** 2009. A perspective on antiviral resistance. *J Clin Virol* **46**:3-8.
80. **Gupta, A., J. J. Gartner, P. Sethupathy, A. G. Hatzigeorgiou, and N. W. Fraser.** 2006. Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature* **442**:82-5.
81. **Haas, J., U. Meyding-Lamade, A. Fath, K. Stingele, B. Storch-Hagenlocher, and B. Wildemann.** 1999. Acyclovir treatment of experimentally induced herpes simplex virus encephalitis: monitoring the changes in immunologic NO synthase expression and viral load within brain tissue of SJL mice. *Neurosci Lett* **264**:129-32.
82. **Halford, W. P., J. L. Maender, and B. M. Gebhardt.** 2005. Re-evaluating the role of natural killer cells in innate resistance to herpes simplex virus type 1. *Virol J* **2**:56.
83. **Hannah, B. P., T. M. Cairns, F. C. Bender, J. C. Whitbeck, H. Lou, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen.** 2009. Glycoprotein B of herpes simplex virus associates with target membranes via its fusion loops. *J Virol*.
84. **Hannah, B. P., T. M. Cairns, F. C. Bender, J. C. Whitbeck, H. Lou, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen.** 2009. Herpes simplex virus glycoprotein B associates with target membranes via its fusion loops. *J Virol* **83**:6825-36.
85. **Hannah, B. P., E. E. Heldwein, F. C. Bender, G. H. Cohen, and R. J. Eisenberg.** 2007. Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B. *J Virol* **81**:4858-65.
86. **Harrison, S. C.** 2008. Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**:690-8.

87. **Heldwein, E. E., and C. Krummenacher.** 2008. Entry of herpesviruses into mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* **65**:1653-68.
88. **Heldwein, E. E., H. Lou, F. C. Bender, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and S. C. Harrison.** 2006. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* **313**:217-20.
89. **Hellenbrand, W., W. Thierfelder, B. Muller-Pebody, O. Hamouda, and T. Breuer.** 2005. Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**:131-5.
90. **Hemming, V. G.** 2001. Use of intravenous immunoglobulins for prophylaxis or treatment of infectious diseases. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:859-63.
91. **Herget, G. W., U. N. Riede, A. Schmitt-Graff, M. Lubbert, D. Neumann-Haefelin, and G. Kohler.** 2005. Generalized herpes simplex virus infection in an immunocompromised patient--report of a case and review of the literature. *Pathol Res Pract* **201**:123-9.
92. **Herold, B. C., D. WuDunn, N. Soltys, and P. G. Spear.** 1991. Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J Virol* **65**:1090-8.
93. **Highlander, S. L., W. H. Cai, S. Person, M. Levine, and J. C. Glorioso.** 1988. Monoclonal antibodies define a domain on herpes simplex virus glycoprotein B involved in virus penetration. *J Virol* **62**:1881-8.
94. **Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-9.
95. **Hochuli, E.** 1988. Large-scale chromatography of recombinant proteins. *J Chromatogr* **444**:293-302.
96. **Honess, R. W.** 1984. Herpes simplex and 'the herpes complex': diverse observations and a unifying hypothesis. The eighth Fleming lecture. *J Gen Virol* **65 (Pt 12)**:2077-107.
97. **Honess, R. W., and D. H. Watson.** 1977. Unity and diversity in the herpesviruses. *J Gen Virol* **37**:15-37.
98. **Imai, M., K. Sugimoto, K. Okazaki, and H. Kida.** 1998. Fusion of influenza virus with the endosomal membrane is inhibited by monoclonal antibodies to defined epitopes on the hemagglutinin. *Virus Res* **53**:129-39.
99. **Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik.** 2002. Immunologie, vol. 5-te Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
100. **Johansson, P. J., T. Hallberg, V. A. Oxelius, A. Grubb, and J. Blomberg.** 1984. Human immunoglobulin class and subclass specificity of Fc receptors induced by herpes simplex virus type 1. *J Virol* **50**:796-804.
101. **Johansson, P. J., E. B. Myhre, and J. Blomberg.** 1985. Specificity of Fc receptors induced by herpes simplex virus type 1: comparison of immunoglobulin G from different animal species. *J Virol* **56**:489-94.
102. **Johansson, P. J., A. K. Schroder, F. A. Nardella, M. Mannik, and P. Christensen.** 1986. Interaction between herpes simplex type 1-induced Fc receptor and human and rabbit immunoglobulin G (IgG) domains. *Immunology* **58**:251-5.
103. **Johnson, D. C., and M. T. Huber.** 2002. Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *J Virol* **76**:1-8.
104. **Johnson, S., C. Oliver, G. A. Prince, V. G. Hemming, D. S. Pfarr, S. C. Wang, M. Dormitzer, J. O'Grady, S. Koenig, J. K. Tamura, R. Woods, G. Bansal, D. Couchenour, E. Tsao, W. C. Hall, and J. F. Young.** 1997. Development of a

- humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* **176**:1215-24.
105. **Jones, P. T., P. H. Dear, J. Foote, M. S. Neuberger, and G. Winter.** 1986. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* **321**:522-5.
 106. **Kabat, E. A., and National Institutes of Health (U.S.).** 1991. Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed. U.S. Dept. of Health and Human Services Public Health Service National Institutes of Health Washington, D.C.
 107. **Kaelin, K., S. Dezelee, M. J. Masse, F. Bras, and A. Flamand.** 2000. The UL25 protein of pseudorabies virus associates with capsids and localizes to the nucleus and to microtubules. *J Virol* **74**:474-82.
 108. **Kalergis, A. M., and J. V. Ravetch.** 2002. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells. *J Exp Med* **195**:1653-9.
 109. **Kang, W., R. Mukerjee, and N. W. Fraser.** 2003. Establishment and maintenance of HSV latent infection is mediated through correct splicing of the LAT primary transcript. *Virology* **312**:233-44.
 110. **Kärber, G.** 1938. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [A contribution to the collective treatment of a pharmacological experimental series]. . *Archiv Experimentelle Pathol Pharmacol* **162**:480-483
 111. **Karlson, P., D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs, and W. Gerok.** 2005. Biochemie und Pathobiochemie, vol. 15-te Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
 112. **Kaufman, E. N., and R. K. Jain.** 1992. Effect of bivalent interaction upon apparent antibody affinity: experimental confirmation of theory using fluorescence photobleaching and implications for antibody binding assays. *Cancer Res* **52**:4157-67.
 113. **Keller, M. A., and E. R. Stiehm.** 2000. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **13**:602-14.
 114. **Kern, A. B., and B. L. Schiff.** 1964. Vaccine Therapy in Recurrent Herpes Simplex. *Arch Dermatol* **89**:844-5.
 115. **Kieff, E. D., S. L. Bachenheimer, and B. Roizman.** 1971. Size, composition, and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2. *J Virol* **8**:125-32.
 116. **Kipriyanov, S. M., O. A. Kupriyanova, M. Little, and G. Moldenhauer.** 1996. Rapid detection of recombinant antibody fragments directed against cell-surface antigens by flow cytometry. *J Immunol Methods* **196**:51-62.
 117. **Koelle, D. M., C. M. Posavad, G. R. Barnum, M. L. Johnson, J. M. Frank, and L. Corey.** 1998. Clearance of HSV-2 from recurrent genital lesions correlates with infiltration of HSV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* **101**:1500-8.
 118. **Kohl, S.** 1991. Role of antibody-dependent cellular cytotoxicity in defense against herpes simplex virus infections. *Rev Infect Dis* **13**:108-14.
 119. **Kohl, S., N. C. Strynadka, R. S. Hodges, and L. Pereira.** 1990. Analysis of the role of antibody-dependent cellular cytotoxic antibody activity in murine neonatal herpes simplex virus infection with antibodies to synthetic peptides of glycoprotein D and monoclonal antibodies to glycoprotein B. *J Clin Invest* **86**:273-8.
 120. **Kohler, G., and C. Milstein.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-7.
 121. **Kostavasili, I., A. Sahu, H. M. Friedman, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, and J. D. Lambiris.** 1997. Mechanism of complement inactivation by glycoprotein C of herpes simplex virus. *J Immunol* **158**:1763-71.

122. **Kousoulas, K. G., B. Huo, and L. Pereira.** 1988. Antibody-resistant mutations in cross-reactive and type-specific epitopes of herpes simplex virus 1 glycoprotein B map in separate domains. *Virology* **166**:423-31.
123. **Krauss, J., M. A. Arndt, A. C. Martin, H. Liu, and S. M. Rybak.** 2003. Specificity grafting of human antibody frameworks selected from a phage display library: generation of a highly stable humanized anti-CD22 single-chain Fv fragment. *Protein Eng* **16**:753-9.
124. **Krautwald, M., C. Maresch, B. G. Klupp, W. Fuchs, and T. C. Mettenleiter.** 2008. Deletion or green fluorescent protein tagging of the pUL35 capsid component of pseudorabies virus impairs virus replication in cell culture and neuroinvasion in mice. *J Gen Virol* **89**:1346-51.
125. **Krummenacher, C., V. M. Supekar, J. C. Whitbeck, E. Lazear, S. A. Connolly, R. J. Eisenberg, G. H. Cohen, D. C. Wiley, and A. Carfi.** 2005. Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *Embo J* **24**:4144-53.
126. **Kuhn, J. E., G. Dunkler, K. Munk, and R. W. Braun.** 1987. Analysis of the IgM and IgG antibody response against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) structural and nonstructural proteins. *J Med Virol* **23**:135-50.
127. **Kuritzkes, D. R., J. Jacobson, W. G. Powderly, E. Godofsky, E. DeJesus, F. Haas, K. A. Reimann, J. L. Larson, P. O. Yarbough, V. Curt, and W. R. Shanahan, Jr.** 2004. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1. *J Infect Dis* **189**:286-91.
128. **Labrijn, A. F., R. C. Aalberse, and J. Schuurman.** 2008. When binding is enough: nonactivating antibody formats. *Curr Opin Immunol* **20**:479-85.
129. **Labrijn, A. F., A. O. Buijsse, E. T. van den Bremer, A. Y. Verwilligen, W. K. Bleeker, S. J. Thorpe, J. Killestein, C. H. Polman, R. C. Aalberse, J. Schuurman, J. G. van de Winkel, and P. W. Parren.** 2009. Therapeutic IgG4 antibodies engage in Fab-arm exchange with endogenous human IgG4 in vivo. *Nat Biotechnol* **27**:767-71.
130. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
131. **Lahat, E., J. Barr, G. Barkai, G. Paret, N. Brand, and A. Barzilai.** 1999. Long term neurological outcome of herpes encephalitis. *Arch Dis Child* **80**:69-71.
132. **Lapidot, T., Y. Fajerman, and O. Kollet.** 1997. Immune-deficient SCID and NOD/SCID mice models as functional assays for studying normal and malignant human hematopoiesis. *J Mol Med* **75**:664-73.
133. **Leen, W. G., C. M. Weemaes, M. M. Verbeek, M. A. Willemsen, and J. J. Rotteveel.** 2006. Chronic herpes simplex virus encephalitis in childhood. *Pediatr Neurol* **35**:57-61.
134. **Lemmon, M. A.** 2003. Phosphoinositide recognition domains. *Traffic* **4**:201-13.
135. **Li, M., H. Guo, Q. Ding, and C. Zheng.** 2009. A Multiple Functional Protein: the Herpes Simplex Virus Type 1 Tegument Protein VP22. *Virologica Sinica* **24**:153-161.
136. **Lo, B. K. C.** 2003. *Antibody Engineering: Methods and Protocols* vol. volume 1. Springer, Berlin.
137. **Lolis, M. S., L. Gonzalez, P. J. Cohen, and R. A. Schwartz.** 2008. Drug-resistant herpes simplex virus in HIV infected patients. *Acta Dermatovenerol Croat* **16**:204-8.
138. **Lubinski, J. M., M. Jiang, L. Hook, Y. Chang, C. Sarver, D. Mastellos, J. D. Lambris, G. H. Cohen, R. J. Eisenberg, and H. M. Friedman.** 2002. Herpes simplex virus type 1 evades the effects of antibody and complement in vivo. *J Virol* **76**:9232-41.

139. **Malvy, D., K. Ezzedine, F. Lancon, B. Halioua, A. Rezvani, S. Bertrais, B. Chanzy, J. E. Malkin, P. Morand, C. De Labareyre, S. Hercberg, and A. El Hasnaoui.** 2007. Epidemiology of orofacial herpes simplex virus infections in the general population in France: results of the HERPIMAX study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **21**:1398-403.
140. **Marasco, W. A., and J. Sui.** 2007. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol* **25**:1421-34.
141. **McGeoch, D. J., M. A. Dalrymple, A. Dolan, D. McNab, L. J. Perry, P. Taylor, and M. D. Challberg.** 1988. Structures of herpes simplex virus type 1 genes required for replication of virus DNA. *J Virol* **62**:444-53.
142. **Mertz, G. J., R. Ashley, R. L. Burke, J. Benedetti, C. Critchlow, C. C. Jones, and L. Corey.** 1990. Double-blind, placebo-controlled trial of a herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccine in persons at high risk for genital herpes infection. *J Infect Dis* **161**:653-60.
143. **Mettenleiter, T. C.** 2004. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* **106**:167-80.
144. **Mettenleiter, T. C., and T. Minson.** 2006. Egress of alphaherpesviruses. *J Virol* **80**:1610-1; author reply 1611-2.
145. **Milligan, G. N., D. I. Bernstein, and N. Bourne.** 1998. T lymphocytes are required for protection of the vaginal mucosae and sensory ganglia of immune mice against reinfection with herpes simplex virus type 2. *J Immunol* **160**:6093-100.
146. **Minagawa, H., S. Sakuma, S. Mohri, R. Mori, and T. Watanabe.** 1988. Herpes simplex virus type 1 infection in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *Arch Virol* **103**:73-82.
147. **Modis, Y., S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison.** 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* **427**:313-9.
148. **Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen.** 2003. *Molekulare Virologie*, vol. 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
149. **Moler, F. W., R. W. Brown, R. G. Faix, and J. R. Gilsdorf.** 1999. Comments on palivizumab (Synagis). *Pediatrics* **103**:495-7.
150. **Morfin, F., and D. Thouvenot.** 2003. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J Clin Virol* **26**:29-37.
151. **Morrison, S. L., M. J. Johnson, L. A. Herzenberg, and V. T. Oi.** 1984. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:6851-5.
152. **Nagafuchi, S., H. Oda, R. Mori, and T. Taniguchi.** 1979. Mechanism of acquired resistance to herpes simplex virus infection as studied in nude mice. *J Gen Virol* **44**:715-23.
153. **Nagashunmugam, T., J. Lubinski, L. Wang, L. T. Goldstein, B. S. Weeks, P. Sundaresan, E. H. Kang, G. Dubin, and H. M. Friedman.** 1998. In vivo immune evasion mediated by the herpes simplex virus type 1 immunoglobulin G Fc receptor. *J Virol* **72**:5351-9.
154. **Navarro, D., P. Paz, and L. Pereira.** 1992. Domains of herpes simplex virus I glycoprotein B that function in virus penetration, cell-to-cell spread, and cell fusion. *Virology* **186**:99-112.
155. **Newman, R., K. Hariharan, M. Reff, D. R. Anderson, G. Braslawsky, D. Santoro, N. Hanna, P. J. Bugelski, M. Brigham-Burke, C. Crysler, R. C. Gagnon, P. Dal Monte, M. L. Doyle, P. C. Hensley, M. P. Reddy, R. W. Sweet, and A. Truneh.** 2001. Modification of the Fc region of a primatized IgG antibody to human CD4 retains its ability to modulate CD4 receptors but does not deplete CD4(+) T cells in chimpanzees. *Clin Immunol* **98**:164-74.

156. **Nielsen, U. B., G. P. Adams, L. M. Weiner, and J. D. Marks.** 2000. Targeting of bivalent anti-ErbB2 diabody antibody fragments to tumor cells is independent of the intrinsic antibody affinity. *Cancer Res* **60**:6434-40.
157. **Ojala, P. M., B. Sodeik, M. W. Ebersold, U. Kutay, and A. Helenius.** 2000. Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Mol Cell Biol* **20**:4922-31.
158. **Oliphant, T., M. Engle, G. E. Nybakken, C. Doane, S. Johnson, L. Huang, S. Gorlatov, E. Mehlhop, A. Marri, K. M. Chung, G. D. Ebel, L. D. Kramer, D. H. Fremont, and M. S. Diamond.** 2005. Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nat Med* **11**:522-30.
159. **Park, N. H., D. Pavan-Langston, S. L. McLean, and D. M. Albert.** 1979. Therapy of experimental herpes simplex encephalitis with aciclovir in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **15**:775-9.
160. **Pellett, P. E., and B. Roizman.** 2007. The Family Herpesviridae: A brief introduction. *Fields' Virology 5th Edition*. D.M. Knipe, P. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, Editors. Lippincott-Williams and Wilkins, New York, N.Y. pp2501-2601.
161. **Podlech, J., F. Hengerer, M. Fleck, I. Walev, and D. Falke.** 1996. Replication of herpes simplex virus type 1 and 2 in the medulla of the adrenal gland after vaginal infection of mice. *Arch Virol* **141**:1999-2008.
162. **Poljak, R. J.** 1973. X-ray crystallographic studies of immunoglobulins. *Contemp Top Mol Immunol* **2**:1-26.
163. **Pollack, P., and J. R. Groothuis.** 2002. Development and use of palivizumab (Synagis): a passive immunoprophylactic agent for RSV. *J Infect Chemother* **8**:201-6.
164. **Posner, M. R., T. Hideshima, T. Cannon, M. Mukherjee, K. H. Mayer, and R. A. Byrn.** 1991. An IgG human monoclonal antibody that reacts with HIV-1/GP120, inhibits virus binding to cells, and neutralizes infection. *J Immunol* **146**:4325-32.
165. **Preston, V. G., J. Murray, C. M. Preston, I. M. McDougall, and N. D. Stow.** 2008. The UL25 gene product of herpes simplex virus type 1 is involved in uncoating of the viral genome. *J Virol* **82**:6654-66.
166. **Ravetch, J. V., and S. Bolland.** 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **19**:275-90.
167. **Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena.** 1999. Fcgamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* **189**:371-80.
168. **Reske, A., G. Pollara, C. Krummenacher, B. M. Chain, and D. R. Katz.** 2007. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol* **17**:205-15.
169. **Riechmann, L., M. Clark, H. Waldmann, and G. Winter.** 1988. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* **332**:323-7.
170. **Roberts, S., J. C. Cheetham, and A. R. Rees.** 1987. Generation of an antibody with enhanced affinity and specificity for its antigen by protein engineering. *Nature* **328**:731-4.
171. **Roche, S., S. Bressanelli, F. A. Rey, and Y. Gaudin.** 2006. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **313**:187-91.
172. **Roche, S., F. A. Rey, Y. Gaudin, and S. Bressanelli.** 2007. Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* **315**:843-8.
173. **Roizman, B., and A. E. Sears.** 1996. Herpes Simplex Viruses and their replication. *In* B.N.Fields, D.M.Knipe, P.M.Howley *Fields virology*, 3rd. ed, vol. 2.Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.

174. **Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**:487-91.
175. **Salfeld, J. G.** 2007. Isotype selection in antibody engineering. *Nat Biotechnol* **25**:1369-72.
176. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
177. **Satoh, T., J. Arai, T. Suenaga, J. Wang, A. Kogure, J. Uehori, N. Arase, I. Shiratori, S. Tanaka, Y. Kawaguchi, P. G. Spear, L. L. Lanier, and H. Arase.** 2008. PILRalpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* **132**:935-44.
178. **Schroff, R. W., K. A. Foon, S. M. Beatty, R. K. Oldham, and A. C. Morgan, Jr.** 1985. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res* **45**:879-85.
179. **Schuurman, J., G. J. Perdok, A. D. Gorter, and R. C. Aalberse.** 2001. The inter-heavy chain disulfide bonds of IgG4 are in equilibrium with intra-chain disulfide bonds. *Mol Immunol* **38**:1-8.
180. **Segal, D. M., E. A. Padlan, G. H. Cohen, S. Rudikoff, M. Potter, and D. R. Davies.** 1974. The three-dimensional structure of a phosphorylcholine-binding mouse immunoglobulin Fab and the nature of the antigen binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:4298-302.
181. **Shieh, M. T., D. WuDunn, R. I. Montgomery, J. D. Esko, and P. G. Spear.** 1992. Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans. *J Cell Biol* **116**:1273-81.
182. **Shulman, M., C. D. Wilde, and G. Kohler.** 1978. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* **276**:269-70.
183. **Shultz, L. D., P. A. Schweitzer, S. W. Christianson, B. Gott, I. B. Schweitzer, B. Tennent, S. McKenna, L. Mobraaten, T. V. Rajan, D. L. Greiner, and et al.** 1995. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* **154**:180-91.
184. **Shuman, S.** 1994. Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* **269**:32678-84.
185. **Silverman, J. L., S. Sharma, T. M. Cairns, and E. E. Heldwein.** 2010. Fusion-deficient insertion mutants of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B adopt the trimeric postfusion conformation. *J Virol* **84**:2001-12.
186. **Skehel, J. J., and D. C. Wiley.** 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**:531-69.
187. **Slobedman, B., S. Efstathiou, and A. Simmons.** 1994. Quantitative analysis of herpes simplex virus DNA and transcriptional activity in ganglia of mice latently infected with wild-type and thymidine kinase-deficient viral strains. *J Gen Virol* **75** (Pt 9):2469-74.
188. **Spear, P. G.** 2004. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* **6**:401-10.
189. **Spear, P. G., and R. Longnecker.** 2003. Herpesvirus entry: an update. *J Virol* **77**:10179-85.
190. **Spearman, C.** 1908. The method of 'right and wrong cases' ('constant stimuli') without Gauss's formulae. *Br J Psychology* **2**:227-242.
191. **Sprague, E. R., C. Wang, D. Baker, and P. J. Bjorkman.** 2006. Crystal structure of the HSV-1 Fc receptor bound to Fc reveals a mechanism for antibody bipolar bridging. *PLoS Biol* **4**:e148.

192. **Stefanov, R., and B. D. Dimitrov.** 1999. Cytomegalovirus infection in infants: an example of a chronopharmacological approach. *Folia Med (Plovdiv)* **41**:20-4.
193. **Steiner, I., and P. G. Kennedy.** 1995. Herpes simplex virus latent infection in the nervous system. *J Neurovirol* **1**:19-29.
194. **Steven, A. C., and P. G. Spear.** 2006. Biochemistry. Viral glycoproteins and an evolutionary conundrum. *Science* **313**:177-8.
195. **Stevens, J. G., E. K. Wagner, G. B. Devi-Rao, M. L. Cook, and L. T. Feldman.** 1987. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* **235**:1056-9.
196. **Storch, G. A.** 1998. Humanized monoclonal antibody for prevention of respiratory syncytial virus infection. *Pediatrics* **102**:648-51.
197. **Stranska, R., R. Schuurman, E. Nienhuis, I. W. Goedegebuure, M. Polman, J. F. Weel, P. M. Wertheim-Van Dillen, R. J. Berkhout, and A. M. van Loon.** 2005. Survey of acyclovir-resistant herpes simplex virus in the Netherlands: prevalence and characterization. *J Clin Virol* **32**:7-18.
198. **Straus, S. E., L. Corey, R. L. Burke, B. Savarese, G. Barnum, P. R. Krause, R. G. Kost, J. L. Meier, R. Sekulovich, S. F. Adair, and et al.** 1994. Placebo-controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes. *Lancet* **343**:1460-3.
199. **Subramanian, R. P., and R. J. Geraghty.** 2007. Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**:2903-8.
200. **Thurlow, J. K., M. Murphy, N. D. Stow, and V. G. Preston.** 2006. Herpes simplex virus type 1 DNA-packaging protein UL17 is required for efficient binding of UL25 to capsids. *J Virol* **80**:2118-26.
201. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.
202. **Turcotte, S., J. Letellier, and R. Lippe.** 2005. Herpes simplex virus type 1 capsids transit by the trans-Golgi network, where viral glycoproteins accumulate independently of capsid egress. *J Virol* **79**:8847-60.
203. **Ubol, S., B. Levine, S. H. Lee, N. S. Greenspan, and D. E. Griffin.** 1995. Roles of immunoglobulin valency and the heavy-chain constant domain in antibody-mediated downregulation of Sindbis virus replication in persistently infected neurons. *J Virol* **69**:1990-3.
204. **Umbach, J. L., M. F. Kramer, I. Jurak, H. W. Karnowski, D. M. Coen, and B. R. Cullen.** 2008. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* **454**:780-3.
205. **van der Neut Kolfshoten, M., J. Schuurman, M. Losen, W. K. Bleeker, P. Martinez-Martinez, E. Vermeulen, T. H. den Bleker, L. Wiegman, T. Vink, L. A. Aarden, M. H. De Baets, J. G. van de Winkel, R. C. Aalberse, and P. W. Parren.** 2007. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* **317**:1554-7.
206. **Van Dyke, M. W., M. Sirito, and M. Sawadogo.** 1992. Single-step purification of bacterially expressed polypeptides containing an oligo-histidine domain. *Gene* **111**:99-104.
207. **van Nunen, A. B., R. A. de Man, R. A. Heijtkink, A. C. Vossen, and S. W. Schalm.** 2002. Passive immunization of chronic hepatitis B patients on lamivudine therapy: a feasible issue? *J Viral Hepat* **9**:221-8.
208. **Vogt, M. R., B. Moesker, J. Goudsmit, M. Jongeneelen, S. K. Austin, T. Oliphant, S. Nelson, T. C. Pierson, J. Wilschut, M. Throsby, and M. S. Diamond.** 2009.

- Human monoclonal antibodies against West Nile virus induced by natural infection neutralize at a postattachment step. *J Virol* **83**:6494-507.
209. **Wang, J., Q. Fan, T. Satoh, J. Ariei, L. L. Lanier, P. G. Spear, Y. Kawaguchi, and H. Arase.** 2009. Binding of herpes simplex virus glycoprotein B (gB) to paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha depends on specific sialylated O-linked glycans on gB. *J Virol* **83**:13042-5.
210. **Webster, R. G., and W. G. Laver.** 1967. Preparation and properties of antibody directed specifically against the neuraminidase of influenza virus. *J Immunol* **99**:49-55.
211. **Weir, J. P.** 2001. Regulation of herpes simplex virus gene expression. *Gene* **271**:117-30.
212. **Whitley, R. J., and B. Roizman.** 2002. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest* **110**:145-51.
213. **Wildy, P., W. C. Russell, and R. W. Horne.** 1960. The morphology of herpes virus. *Virology* **12**:204-22.
214. **Yasumura, Y., and Y. Kawakita.** 1963. Studies on SV40 in tissue culture - preliminary step for cancer research in vitro. *Nihon Rinsho* **21**:1201-1215.
215. **Zeitlin, L., P. E. Castle, K. J. Whaley, T. R. Moench, and R. A. Cone.** 1998. Comparison of an anti-HSV-2 monoclonal IgG and its IgA switch variant for topical immunoprotection of the mouse vagina. *J Reprod Immunol* **40**:93-101.
216. **Zeitlin, L., S. S. Olmsted, T. R. Moench, M. S. Co, B. J. Martinell, V. M. Paradkar, D. R. Russell, C. Queen, R. A. Cone, and K. J. Whaley.** 1998. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nat Biotechnol* **16**:1361-4.
217. **Zeitlin, L., K. J. Whaley, P. P. Sanna, T. R. Moench, R. Bastidas, A. De Logu, R. A. Williamson, D. R. Burton, and R. A. Cone.** 1996. Topically applied human recombinant monoclonal IgG1 antibody and its Fab and F(ab')₂ fragments protect mice from vaginal transmission of HSV-2. *Virology* **225**:213-5.
218. **Zhu, Z., and P. A. Schaffer.** 1995. Intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 major transcriptional regulatory protein, ICP4, is affected by ICP27. *J Virol* **69**:49-59.
219. **Zwick, M. B., R. Jensen, S. Church, M. Wang, G. Stiegler, R. Kunert, H. Katinger, and D. R. Burton.** 2005. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *J Virol* **79**:1252-61.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

µg..... Mikrogramm

µl Mikroliter

aa Aminosäure (Amino Acid)

ADCC..... Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität

b, bp, kb..... Basen, Basenpaar(e), Kilobasen

BSA Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)

cDNA komplementäre DNA (complementary DNA)

ch2c Chimäre Variante des mAk 2c

CIP.....	Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Calf Intestine Phosphatase)
c-myc.....	c-myc-Epitop (zelluläres Proto-Onkogen)
C-terminal.....	am Carboxyl-Ende eines Proteins
C γ	konstante Region der schweren Kette eines IgG-Antikörpers
C κ	konstante Region der κ -Kette eines Antikörpers
CPE.....	Zytopathischer Effekt (Cytopathic Effect)
Da, kDa.....	Dalton, kiloDalton
ddH ₂ O.....	zweifach destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS.....	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ds	Doppelstrang
E	Extinktion
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
ELISA.....	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	und andere (<i>et alii</i> bzw. <i>et aliae</i>)
F.....	Farad (SI-Einheit für elektrische Kapazität)
FACS.....	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorting)
FCS.....	fötales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
FR.....	weitgehend konstante Sequenzen, welche die hypervariablen Regionen flankieren (Framework Regions) Fv Ein aus den variablen Domänen der leichten und schweren Kette bestehendes Antikörper-Fragment
g.....	Gramm; Erdbeschleunigung
gB	Glykoprotein B
GS.....	Glutamin-Synthetase
HCl	Salzsäure
HEPES.....	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
HSV	Herpes Simplex Virus

hu2c	Humanisierte Variante des mAk 2c
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig.....	Immunglobulin
IMDM.....	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IP	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
LB.....	Bakterien-Nährmedium (<i>Luria Bertani</i>)
M	molar
mAk.....	monoklonaler Antikörper
mg.....	Milligramm
min.....	Minute
ml.....	Milliliter
MOI	Vielfaches der Viruslast pro Zelle (Multiplicity Of Infection)
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MWCO	Molecular Weight Cut Off
ng.....	Nanogramm
NK-Zellen.....	Natürliche Killerzellen
NS0.....	Maus-Myelomzelllinie (Non-Secreting cell number zero)
N-terminal	am Aminoterminal eines Proteins
OD	optische Dichte
Ω	SI-Einheit für Elektrischen Widerstand: Ohm
p.i.....	nach Infektion (post infectionem)
PBS.....	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PFU.....	Anzahl infektiöser Partikel (Plaque Forming Units)
pH.....	ponus Hydrogenii
pmol, μ mol	Pikomol, Mikromol
PP	Periplasma
RACE-PCR	PCR-Methode zur authentischen Replikation von cDNA-Enden (Rapid Amplification of cDNA Ends)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds Per Minute)
rRNA	ribosomale RNA
RSV	Respiratorisches Syncytial-Virus

RT	Reverse Transkriptase; Real Time
scFv	Fragment, dessen variable leichte und schwere Kette durch einen Peptidlinker verbunden sind (single chain-Fv)
SCID	kombinierter B/T-Zell-Immundefekt (Severe Combined Immunodeficiency)
SI	Internationales Einheitssystem
Tab	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCID ₅₀	Virusmenge, welche in 50% der Zellkulturen zu pathogenen Veränderungen (CPE) führt (Median Tissue Culture Infective Dosis)
TE	Tris/EDTA
T _m	Schmelztemperatur
tRNA	transfer-RNA
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurate
U	Unit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen (Volume per Volume)
V _H	variable Region der schweren Kette eines Antikörpers
V _L	variable Region der leichten Kette eines Antikörpers
w/v	Masse am Gesamtvolumen (Weight per Volume)
YT	Yeast/Trypton Medium
λ	Wellenlänge

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Herpes-Virions.....	9
Abb. 2: Übersicht der offenen Leserahmen (ORFs) im Genom von HSV-1.....	11
Abb. 3: Schematische Darstellung des herpesviralen Replikationszyklus.	13
Abb. 4: Mechanismen der antikörpervermittelten Virusneutralisation	19
Abb. 5: HSV-1 Glykoprotein B.	20
Abb. 6: Effekt des mAk 2c auf den Verlauf der HSV-Infektion bei immunsupprimierten Mäusen.	21
Abb. 7: Schematische Darstellung eines monomeren Ig-Moleküls.	22
Abb. 8: Schematische Darstellung proteolytisch und gentechnisch hergestellter Antikörperfragmente.....	24
Abb. 9: Schematische Darstellung einer Antikörper-Chimärisierung bzw. Humanisierung	26
Abb. 10: TA-Klonierungsvektoren pCR2.1-TOPO und pCR4-TOPO (Invitrogen).	42
Abb. 11: Schematische Darstellung des bakteriellen Expressionsvektors <i>pHOG21</i>	43
Abb. 12: Zwischenklonierungs-Vektor pEUC6B.	43
Abb. 13: Expressionsvektor pEE12.1	44
Abb. 14: Das Prinzip der RACE-PCR.	51
Abb. 15: Analyse des mAk 2c nach quantitativer Aufreinigung mittels Protein-A	79
Abb. 16: Analyse der durch Papain-Verdau des mAk 2c generierten 2c-Fab-Fragmente.....	80
Abb. 17: Aufreinigung der durch Pepsin-Spaltung des mAk 2c generierten 2c-F(ab') ₂ -Fragmente.....	81
Abb. 18: Aminosäuresequenzen der V _H - und V _L -Domänen des mAk 2c.	82
Abb. 19: Schematische Darstellung der Klonierung des 2c-scFv-Gens.....	84
Abb. 20: Aufreinigung des 2c-scFv aus dem Periplasma von TG1 Bakterien.	85
Abb. 21: Schematische Darstellung des 2c-scFv in dem Expressionsvektor pEE12.	86
Abb. 22: Aufreinigung des 2c-scFv-Antikörpers aus NSO-Zellkulturüberständen.	87
Abb. 23: Reaktivität des mAk 2c gegenüber HSV-1 gB.....	88
Abb. 24: <i>In vitro</i> Neutralisation von HSV-1 bzw. HSV-2.	91
Abb. 25: Neutralisationseffizienz kreuzverbundener 2c-Fab-Fragmente.....	92
Abb. 26: Vergleich des Neutralisationsverhaltens von mAk 2c und polyklonalen humanen IgG.	93
Abb. 27: Inhibition der direkten HSV-1 Ausbreitung von Zelle zu Zelle durch gB-spezifischen Antikörper.	94
Abb. 28: Sequenzabgleich der schweren und leichten Kette (V _H und V _L).	97
Abb. 29: Bestimmung der funktionellen Affinität rekombinant hergestellter Antikörper.	99
Abb. 30: Kompetitionsstudien.	100
Abb. 31: Neutralisationseffizienz der rekombinant hergestellten HSV-spezifischen Antikörper.	101
Abb. 32: Untersuchung der biophysikalischen Stabilität rekombinanter Antikörper.....	102
Abb. 33: Inhibition der direkten Virus-Ausbreitung von Zelle zu Zelle durch mAk ch2c und mAk hu2c V1. ...	103
Abb. 34: Untersuchung der Komplementabhängigkeit von mAk 2c und mAk hu2c V1.	104
Abb. 35: BW5147-Reportersystem.	106
Abb. 36: Aktivierung von Fcγ-Rezeptoren durch mAk 2c bzw. mAk hu2c V1.....	108
Abb. 37: Neutralisation von klinischen HSV-Isolaten und Laborstämmen durch mAk hu2c V1.....	111
Abb. 38: Etablierung des HSV-NOD/SCID-Mausmodells.	113
Abb. 39: Überlebensrate von HSV-1 F infizierten NOD/SCID-Mäusen nach Immunisierung mit mAk 2c.....	114
Abb. 40: Viruslast in Organen der PBS-behandelten Kontrolltiere.	116

Abb. 41: Eliminierung der HSV-Replikation durch passive Immunisierung mit mAk hu2c V1 und mAk 2c. ...	118
Abb. 42: Überlebensrate von HSV-1 F infizierten NOD/SCID-Mäusen nach passiver Immunisierung.	118
Abb. 43: Eliminierung der HSV-Replikation durch PEP mit mAk hu2c V1 und mAk 2c.	120
Abb. 44: Überlebensrate von HSV-1 F infizierter Versuchstiere nach PEP mit mAk hu2c V1 und mAk 2c.	121
Abb. 45: Virusreplikation in der Vaginalschleimhaut HSV-1 R10.2 infizierter NOD/SCID-Mäuse.	123
Abb. 46: Postexpositions-Prophylaxe von HSV-1 R10.2 infizierten NOD/SCID-Mäusen mit mAk hu2c V1. ...	123

7.3. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifizierung humanpathogener Herpesviren.	9
Tab. 2: Aktivierung von Effektorzellen durch Antikörper der IgG-Klasse.	24
Tab. 3: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.	38
Tab. 4: In der Durchflusszytometrie verwendete Detektionsantikörper.	40
Tab. 5: Im Westernblot, ELISA und in der Immunhistochemie eingesetzte Antikörper.	40
Tab. 6: Sonstige im Rahmen der Arbeit eingesetzten Antikörper.	40
Tab. 7: Genotyp der verwendeten Bakterienstämme.	46
Tab. 8: Allgemeines PCR-Protokoll zur Amplifikation doppelsträngiger DNA.	48
Tab. 9: Generierung des 2c-scFv durch Fusion der V _H - und V _L -Gene mittels überlappender PCR.	54
Tab. 10: Zusammensetzung der verwendeten SDS-Gele.	61
Tab. 11: Umrechnungskoeffizienten zur Bestimmung der Antikörperkonzentration.	62
Tab. 12: Bestimmung der Subgruppenzugehörigkeit der V-Domänen von mAk 2c.	83
Tab. 13: Funktionelle Affinitäten des murinen mAk 2c sowie generierter 2c-Antikörperfragmente.	90
Tab. 14: Quantifizierung der Virusgenome von HSV-1 bzw. HSV-2 mittels quantitativer RT-PCR.	92
Tab. 15: Humanisierte mAk 2c-Varianten mit Framework-Rückmutationen.	96
Tab. 16: Ausbeute der aufgereinigten rekombinanten Antikörper aus 1 Liter Zellkulturüberstand.	98
Tab. 17: Mittlere Affinitätskonstanten (K _D) der Antikörper mAk 2c, mAk ch2c und mAk hu2c V1-V4.	100
Tab. 18: Aktivierung von BW5147-Reporterzellen.	106
Tab. 19: Herstellung und Neutralisation von Virus-Stocks aus klinischen Patientenproben.	109
Tab. 20: Virustatika-Sensitivität von HSV-Isolaten.	110
Tab. 21: Herstellung und Neutralisation von klinischen Virusisolaten mit Virustatika-Resistenz.	110
Tab. 22: Dosisfindung der zur Prophylaxe einer HSV-Infektion benötigten Antikörper-Dosis.	114
Tab. 23: Mittlere Viruslast in Organen von Mäusen mit einer generalisierten HSV-Infektion.	116
Tab. 24: Prophylaxe der HSV-Infektion durch mAk hu2c V1 und mAk 2c. Übersichtstabelle.	117
Tab. 25: Postexpositions-Prophylaxe der HSV-1 R10.2 Infektion durch mAk hu2c V1. Übersichtstabelle.	122

7.4. Publikationsverzeichnis

Publikationen

A novel cardiotropic murine adenovirus representing a distinct species of mastadenoviruses. Klempa, B., D. H. Kruger, B. Auste, M. Stanko, A. Krawczyk, K. F. Nickel, K. Uberla, and A. Stang. 2009. J Virol **83**:5749-59.

Impact of Valency of a Glycoprotein B Specific Monoclonal Antibody on Neutralization of Herpes Simplex Virus. A. Krawczyk, J.Krauss, A. M. Eis-Hübinger, R. Schwarzenbacher, U. Dittmer, K. E. Schneweis, D. Jäger, M.Roggendorf, and M. A.E. Arndt. 2010 J Virol

Humanized monoclonal antibody for prophylaxis and therapy of Herpes Simplex Virus infections. Das Manuskript befindet sich derzeit in der Vorbereitung zur Einreichung bei der Fachzeitschrift "Journal of Clinical Investigation".

Erfindungsmeldung / Patent

„Humanisierter monoklonaler anti-HSV-Antikörper“

(Roggendorf M., Schneweis K.E., Eis-Hübinger A.M., Krauss J., Arndt M., **Krawczyk A.**, Exner E.).
Erfindungsmeldung ist bei der Universität Duisburg-Essen eingereicht.

Vorträge

Generation and characterisation of a humanized monoclonal antibody for prophylaxis and therapy of Herpes Simplex Virus infections. A. Krawczyk, J.Krauss, A. M. Eis-Hübinger, R. Schwarzenbacher, U. Dittmer, K. E. Schneweis, D. Jäger, M. A.E. Arndt and M.Roggendorf
4th European Congress of Virology (ESCV), Lake Como, Italy 04/2010

Generation and characterisation of a humanized monoclonal antibody for prophylaxis and therapy of Herpes Simplex Virus infections. A. Krawczyk, J.Krauss, A. M. Eis-Hübinger, R. Schwarzenbacher, U. Dittmer, K. E. Schneweis, D. Jäger, M. A.E. Arndt and M.Roggendorf
Forschungstag 2009, Universität Duisburg-Essen (Vortragspreis)

Poster

Generation and characterisation of a humanized monoclonal antibody for prophylaxis and therapy of Herpes Simplex Virus infections. A. Krawczyk, J.Krauss, A. M. Eis-Hübinger, R. Schwarzenbacher, U. Dittmer, K. E. Schneweis, D. Jäger, M. A.E. Arndt and M.Roggendorf
4th European Congress of Virology (ESCV), Lake Como, Italy 04/2010

Generation and characterisation of a humanized monoclonal antibody for prophylaxis and therapy of Herpes Simplex Virus infections. A. Krawczyk, J.Krauss, A. M. Eis-Hübinger, R. Schwarzenbacher, U. Dittmer, K. E. Schneweis, D. Jäger, M. A.E. Arndt and M.Roggendorf
The 19th Annual Meeting of the "Gesellschaft für Virologie", Leipzig 03/2009

7.5. Danksagung

Ich danke herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Roggendorf für die Überlassung eines spannenden und vielseitigen Themas sowie für die sowohl fachlich als auch menschlich hervorragende Betreuung während der Doktorarbeit.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Dr. Michaela Arndt und Dr. Jürgen Krauss für die außerordentlich engagierte wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen hilfreichen Ideen und Ratschläge bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Desweiteren möchte ich mich bei unseren Kooperationspartnern Prof. Anna M. Eis-Hübinger und Prof. Eduard Schneweis für die Ermöglichung dieses Forschungsvorhabens durch Bereitstellung der mAk 2c Hybridomzelllinie, bei Dr. Andrew Martin und Dr. Ludger Große-Hovest für deren Beitrag zum Erfolg dieser Arbeit, sowie bei Prof. Hartmut Hengel und Dr. Henrike Reinhard für die ergebnisreiche Zusammenarbeit am Institut für Virologie in Düsseldorf bedanken.

Ich danke sehr herzlich Prof. Ulf Dittmer für die Möglichkeit der Durchführung experimenteller Arbeiten in seinem Labor und die zahlreichen fruchtbaren Diskussionen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei der gesamten AG Dittmer für die warmherzige Integration in die Arbeitsgruppe bedanken. Besonders danke ich Dr. Gennadiy Zelinskyy, Kirsten Dietze, Kathrin Gibbert und Simone Schimmer für die Hilfestellung bei der Durchführung der Tierexperimente und die freundliche Zusammenarbeit im Labor.

Außerdem danke ich Dr. Jörg Timm, Dr. „Jonny“ Andreas Walker, Dr. Melanie Fiedler, Prof. Stefan Ross, und Prof. Mengji Lu, die bei wissenschaftlichen Fragestellungen immer hilfsbereite Ansprechpartner waren.

Weiterhin möchte ich mich bei allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern des Institutes für Virologie wie auch der AG Arndt/Krauss bedanken, die mich im Laboralltag begleitet haben und mit denen es eine große Freude war zu arbeiten: Evelyn Exner und Tamana Karimi für die Hilfe bei der Antikörperproduktion, Meike Nowak für die Unterstützung bei Mausexperimenten, und natürlich bei allen weiteren wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen mit denen ich zusammenarbeiten durfte.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, für die immerwährende Unterstützung und für eure Hilfe, auf die ich mich jederzeit verlassen konnte.

7.6. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

7.7. Erklärungen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Humanisierung und funktionelle Charakterisierung eines gegen Herpes Simplex Viren Typ-1 und Typ-2 (HSV-1 und HSV-2) gerichteten murinen monoklonalen Antikörpers“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Adalbert Krawczyk befürworte.

Essen, den 24.09.2010

Prof. Dr. med. Michael Roggendorf

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) + e) der Promotionsordnung Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den 24.09.2010

Adalbert Krawczyk

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie und Geografie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den 24.09.2010

Adalbert Krawczyk